

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Shinya
Mayama International Patent Office
4th Floor, Sakurai Building
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
JAPONDate of mailing (day/month/year)
22 March 2002 (22.03.02)Applicant's or agent's file reference
FP00-004PCTInternational application No.
PCT/JP00/05711

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
24 August 2000 (24.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

NYK LOGISTICS TECHNOLOGY INSTITUTE
CO., LTD.
32-84, Sugita 5-chome
Isogo-ku
Yokohama-shi
Kanagawa 235-0033
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

NYK LOGISTICS TECHNOLOGY INSTITUTE
CO., LTD.
Yusen Building 5th Floor
3-2, Marunouchi 2-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0005
Japan
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Akiko KOYAMA

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Shinya
Mayama International Patent Office
4th Floor, Sakurai Building
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2002 (22.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☐ the inventor ☒ the agent ☐ the common representative

Name and Address

MAYAMA, Shinya
Mayama, Hayashi & Mayama
Sakurai Building 4th Floor
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
Japan

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

MAYAMA, Shinya
Mayama International Patent Office
Sakurai Building 4th Floor
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
Japan

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Ms.Setsuko MAYAMA and Mr.Shigenori HAYASHI have renounced their appointments.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Akiko KOYAMA
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
 OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
 Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Shinya
 Mayama International Patent Office
 4th Floor, Sakurai Building
 4-4, Chuorinkan 3-chome
 Yamato-shi
 Kanagawa 242-0007
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2002 (22.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative	
Name and Address MARUYAMA, Akihiko National Institute of Bioscience and Human Technology Agency of Industrial Science and Technology 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibaraki 305-8566 Japan	State of Nationality JP
	State of Residence JP
	Telephone No.
	Facsimile No.
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence	
Name and Address MARUYAMA, Akihiko Tsukuba Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki 305-8561 Japan	State of Nationality JP
	State of Residence JP
	Telephone No.
	Facsimile No.
3. Further observations, if necessary:	
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Akiko KOYAMA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
 OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
 Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Shinya
 Mayama International Patent Office
 Sakurai Building 4th Floor
 4-4, Chuorinkan 3-chome
 Yamato-shi
 Kanagawa 242-0007
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2002 (22.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	
International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

HIGASHIHARA, Takanori
 National Institute of Bioscience
 and Human Technology
 Agency of Industrial Science and
 Technology
 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi
 Ibaraki 305-8566
 Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

HIGASHIHARA, Takanori
 Tsukuba Center, National Institute
 of Advanced Industrial Science and Technology
 1-1, Higashi 1-chome
 Tsukuba-shi
 Ibaraki 305-8561
 Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Akiko KOYAMA

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Shinya
Mayama International Patent Office
4th Floor, Sakurai Building
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2002 (22.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	
	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

FUJITA, Tsunemi
NYK Logistics Technology Institute
Co., Ltd.
32-84, Sugita 5-chome
Isogo-ku
Yokohama-shi
Kanagawa 235-0033
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

FUJITA, Tsunemi
NYK Logistics Technology Institute
Co., Ltd.
Yusen Building 5th Floor
3-2, Marunouchi 2-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 100-0005
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Akiko KOYAMA

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
 OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
 Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Shinya
 Mayama International Patent Office
 4th Floor, Sakurai Building
 4-4, Chuorinkan 3-chome
 Yamato-shi
 Kanagawa 242-0007
 JAPON

Date of mailing (day/month/year) 22 March 2002 (22.03.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-8921 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku Tokyo 100-8921 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: 		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Akiko KOYAMA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

01 March 2001 (01.03.01)

International application No.:

PCT/JP00/05711

Applicant's or agent's file reference:

FP00-004PCT

International filing date:

24 August 2000 (24.08.00)

Priority date:

25 August 1999 (25.08.99)

Applicant:

MARUYAMA, Akihiko et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

24 August 2000 (24.08.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

57
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05711	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	Priority date (day/month/year) 25 August 1999 (25.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68, 1/04, C12N 15/11 // (C12N 15/11, C12R 1:01)		
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>9</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input checked="" type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 24 August 2000 (24.08.00)	Date of completion of this report 22 February 2001 (22.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05711

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05711

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.
- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with.
- ☒ not complied with for the following reasons:

See supplemental sheet for continuation of Box IV. 3.

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- ☒ all parts.
- ☐ the parts relating to claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/05711

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

The requirement of unity of invention in an international application (PCT Rule 13.1) is only satisfied when there is a technical relationship among a group of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art. (PCT Rule 13.2).

The unity of the invention of the present international application was therefore investigated on this basis.

The feature common to the inventions described in Claims 1-10 is "a method for detecting and quantitating microorganisms having specified functions and genes thereof from a natural environment, which includes steps 1)-4)". By contrast, the feature common to the inventions described in Claims 11-23 is "a petroleum degrading bacterium of genus *Cycloclasticus*". Therefore there is no relationship between the inventions described in Claims 1-10 and the inventions described in Claims 11-23 involving a "special technical feature" as stipulated in PCT Rule 13.2. In passing, there is an association with the "microorganism which degrades petroleum" of the invention described in Claim 5; however, a "microorganism which degrades petroleum" was known at the time of filing this international application, and therefore there is also no relationship involving a "special technical feature" between the invention described in Claim 5 and

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/05711

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV. 3.

the inventions described in Claims 11-23.

Therefore, the claims include two inventions: (1)
an invention described in Claims 1-10 and (2) an
invention described in Claims 11-23.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/05711

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-23	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-10, 12-23	YES
	Claims	11	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10, 12-23	YES
	Claims	11	NO

2. Citations and explanations

Document 1: JP, 10-155498, A (Mitsui Engineering and Shipbuilding Co., Ltd.), 16 June 1998
(16.06.98) (Family: none)

Document 2: Allison D. Geiselbecht et al., Applied and Environmental Microbiology, December 1998, Vol. 64, No. 12, pp. 4703-4710

Document 3: Sheryl E. Dyksterhouse et al., International Journal of Systematic Bacteriology, January 1995, Vol. 45, No. 1, pp. 116-123

Document 4: Allison D. Geiselbrecht et al., Applied and Environmental Microbiology, September 1996, Vol. 62, No. 9, pp. 3344-3349

Claims 1-10

The inventions described in Claims 1-10 involve an inventive step relative to Document 1 cited in the international search report.

Document 1 discloses serial dilution of a microorganism with a specific function which can be used in the biological treatment of sewage, culturing said microorganism under conditions which allow propagation and then counting said propagated microorganism and calculating the incidence (equivalent to the predominance) of said microorganism. However, in this method, the

microorganism having a specified function is a known bacillus: this method was not used to detect and quantitate an unknown microorganism having a specified function and the use of this method for such a purpose is not obvious to a person skilled in the art.

Claim 11

The invention described in Claim 11 does not involve an inventive step in the light of Documents 2-4 cited in the international search report.

Documents 2-4 disclose a microorganism of the genus *Cycloclasticus*, and sequences AF093002, AF093003 and AF093004 for 16S rDNA from the microorganism described in Document 2, sequences U12624 and L34955 for 16S rDNA from the microorganism described in Document 3 and sequence U57920 for 16S rDNA from the microorganism described in Document 4 all show high homology ($\geq 93\%$) with the 16S rDNA of SEQ ID NO:1-4. In this connection, rDNA and/or rRNA can generally be used to classify organisms, and if these sequences are related the organisms from which they come can be judged to be related (for example, belong to the same genus); and the reverse procedure of using DNA sequences, etc., to screen for taxonomically similar microorganisms is a commonly known and used technique within the art.

Therefore, constructing probes or primers based on the nucleotide sequences disclosed in Documents 2-4 (the specific sequences can be obtained from a database) and using these to acquire the nucleotide sequences of SEQ ID NO:1-4 for 16S rDNA of microorganisms taxonomically related to the microorganisms described in Documents 2-4 is obvious to a person skilled in the art.

Claims 12-23

The inventions described in Claims 12-23 involve an

inventive step relative to Documents 2-4.

Documents 2-4 disclose bacteria of genus *Cycloclasticus* which degrade aromatic hydrocarbons, and the 16S rDNA thereof. However, they do not mention that these bacteria can degrade petroleum, and this would not be obvious to a person skilled in the art. Therefore, the use of a probe having a sequence in SEQ ID NO:1-4 or part thereof for detecting, quantitating, screening and/or characterizing petroleum-degrading bacteria of genus *Cycloclasticus* is not obvious to a person skilled in the art.

Claim 11

The invention described in Claim 11 is not industrially applicable.

Although the description states that the 16S rDNA of specified microorganisms of genus *Cycloclasticus* which have petroleum-degrading activity has a nucleotide sequence in SEQ ID NO:1-4, it does not state that microorganisms having 16S rDNA with such a nucleotide sequence necessarily have petroleum-degrading activity, and there is no direct relationship between the 16S rDNA nucleotide sequence and petroleum-degrading activity. Therefore, microorganisms having petroleum-degrading activity cannot be characterized, etc., by using the nucleotide sequences in SEQ ID NO:1-4, and the 16S rDNA sequence used cannot be said to be industrially applicable if it merely enables the identification of microorganisms of genus *Cycloclasticus*.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The inventions described in Claims 22 and 23 cover methods for characterizing petroleum-degrading bacteria belonging to genus *Cycloclasticus* by homology with the nucleotide sequence in SEQ ID NO:1. However, although the description states that the 16S rDNA of specified microorganisms of genus *Cycloclasticus* which have petroleum-degrading activity has a nucleotide sequence in SEQ ID NO:1, it does not state that microorganisms having 16S rDNA with such a nucleotide sequence necessarily have petroleum-degrading activity, and there is no direct relationship between the 16S rDNA nucleotide sequence and petroleum degrading activity. Therefore, the description does not explain how to identify petroleum-degrading bacteria by homology with the nucleotide sequence in SEQ ID NO:1, and hence Claims 22 and 23 are not fully supported in the description.

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

間 山 世 津 子

殿

あて名

〒 2 4 2 - 0 0 0 7

神奈川県大和市中央林間3丁目4番4号
サクライビル 4階
間山・林合同技術特許事務所

P C T

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
[PCT規則71.1]

発送日
(日.月.年)

06.03.01

出願人又は代理人
の書類記号

F P 0 0 - 0 0 4 P C T

重要な通知

国際出願番号

P C T / J P 0 0 / 0 5 7 1 1

国際出願日

(日.月.年) 2 4 . 0 8 . 0 0

優先日

(日.月.年) 2 5 . 0 8 . 9 9

出願人 (氏名又は名称)

工業技術院長が代表する日本国

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 B

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416 (1992年7月)

(添付用紙の注意書きを参照)

注 意

1. 文献の写しの請求について
国際予備審査報告に記載された文献であつて国際調査報告に記載されていない文献の複写
特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 F P 0 0 - 0 0 4 P C T	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ I P E A / 4 1 6）を参照すること。		
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 7 1 1	国際出願日 (日.月.年) 2 4 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 5 . 0 8 . 9 9	
国際特許分類 (IPC) I n t . C l ' C 1 2 Q 1 / 6 8 , 1 / 0 4 , C 1 2 N 1 5 / 1 1 // (C 1 2 N 1 5 / 1 1 , C 1 2 R 1 : 0 1)			
出願人 (氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国			

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 2 4 . 0 8 . 0 0	国際予備審査報告を作成した日 2 2 . 0 2 . 0 1		
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生	4 B	8 2 1 4
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8			

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。

そこで、本件国際出願の発明の単一性について検討する。

請求の範囲1-10の発明に共通する事項は「工程1）～4）を含む自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法」であるのに対し、請求の範囲11-23の発明に共通する事項は「*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌」であるから、請求の範囲1-10の発明と請求の範囲11-23の発明との間には、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」は存在しない。なお、請求の範囲5の発明は「石油を分解する微生物」に関連するものではあるが、「石油を分解する微生物」は本国際出願時に公知であったから、請求の範囲5の発明と請求の範囲11-23の発明の間にも、同「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

そうすると、請求の範囲には、①請求の範囲1-10の発明、及び、②請求の範囲11-23の発明、の2発明が包含されている。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

☒ すべての部分

☐ 請求の範囲

に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-23	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-10, 12-23	有
	請求の範囲	11	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-10, 12-23	有
	請求の範囲	11	無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: JP, 10-155498, A (三井造船株式会社)
16.6月.1998 (16.06.98), (ファミリーなし)
- 文献2: GEISELBRECHT, Allison D. et al.,
Applied and Environmental Microbiology, December, 1998, Volume 64,
Number 12, pages 4703-4710
- 文献3: DYKSTERHOUSE, Sheryl E. et al.,
International Journal of Systematic Bacteriology, January, 1995,
Volume 45, Number 1, pages 116-123
- 文献4: GEISELBRECHT, Allison D. et al.,
Applied and Environmental Microbiology, September, 1996,
Volume 62, Number 9, pages 3344-3349

請求の範囲 1-10

請求の範囲 1-10 に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献1 に対して、進歩性を有する。

文献1 には、特定機能である汚水の生物処理に使用し得る微生物を段階希釈し、該微生物が増殖し得る条件で培養を行った後、増殖した該微生物をカウントし、該微生物の出現率（優占度に相当）を計測する方法が記載されている。しかし、この方法における特定機能微生物は既知のバチルス属細菌であって、この方法は未知の特定機能微生物の検出・定量のために使用されるものではないし、この方法をそのような目的で使用することは当該技術分野の専門家にとって自明のものでもない。

請求の範囲 11

請求の範囲 11 に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献2-4 により、進歩性を有しない。

文献2-4 には、*Cycloclasticus* 属の微生物が記載されているところ、文献2 に記載された微生物の16S rDNA配列であるAF093002, AF093003, AF093004の配列、文献3 に記載された微生物の16S rDNA配列であるU12624, L34955の配列、及び、文献4 に記載された微生物の16S rDNA配列であるU57920の配列は、いずれも配列番号1-4の16S rDNAに対して高い相同性(93%以上)を有するものである。ところで、一般に、rDNA やrRNAは生物の分類にも使用されるものであって、これらの配列が類似していれば、対象としている生物は類似している（例えば、同じ属に属する）ものと判断され、逆

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 2 2, 2 3 に記載の発明には、配列番号 1 の塩基配列との相同性により *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定する方法が包含されている。しかし、明細書には、*Cycloclasticus* 属の微生物であって石油分解活性を有していた特定の微生物において、その 16S rDNA 配列が配列番号 1 の塩基配列を有していたことは記載されているものの、16S rDNA 配列が配列番号 1 の塩基配列であれば必ずその微生物は石油分解活性を有するということは記載されていない。そして、16S rDNA の塩基配列と石油分解活性との間には直接の関係は存在しないから、明細書には、配列番号 1 の塩基配列との相同性により、どのようにして石油分解細菌を同定するのかが記載されていないと言える。そうすると、請求の範囲 2 2, 2 3 は、明細書により十分な裏付けをされていないものである。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V.2. 欄の続き

に、rDNA等の配列をキーとして、分類学的に類似の微生物をスクリーニングすることは、当該技術分野の専門家にとって周知・慣用の技術である。
そうすると、文献2-4に記載されたrDNAの塩基配列(具体的な配列は、データベースから入手できる)に基づいて、プローブやプライマーを作成しそれを使用することにより、文献2-4に記載の微生物と分類学的に類似する微生物の16S rDNA配列である配列番号1-4の塩基配列を取得することは、当該技術分野の専門家にとって自明である。

請求の範囲12-23

請求の範囲12-23に記載の発明は、文献2-4に対して、進歩性を有する。
文献2-4には、*Cycloclasticus*属に属し芳香族炭化水素を分解する細菌及びその16S rDNAが記載されているが、これらの細菌が石油を分解し得るものであることは記載されておらず、かつ、このことは当該技術分野の専門家にとって自明のものでもない。したがって、配列番号1-4の塩基配列又はその一部を有するプローブを用いて、*Cycloclasticus*属の石油分解細菌を検出・定量・スクリーニング・同定することも、当該技術分野の専門家にとって自明ではない。

請求の範囲11

請求の範囲11に記載の発明は、産業上の利用可能性を有しない。
明細書には、*Cycloclasticus*属の微生物であって石油分解活性を有していた特定の微生物において、その16S rDNA配列が配列番号1-4の塩基配列を有していたことは記載されているものの、16S rDNA配列が配列番号1-4の塩基配列であれば必ずその微生物は石油分解活性を有するということは記載されていない。そして、16S rDNAの塩基配列と石油分解活性との間には直接の関係は存在しないから、配列番号1-4の塩基配列を使用しても石油分解活性を有する微生物が同定等できるとはいえない。また、単に*Cycloclasticus*属の微生物を同定できるというだけでは、使用した16S rDNA配列が産業上利用可能であるとはいえない。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Setsuko_
Mayama, Hayashi & Mayama
Sakurai Building 4th Floor
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2000 (11.12.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	
Priority date (day/month/year) 25 August 1999 (25.08.99)	
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c)** which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
25 Augu 1999 (25.08.99)	11/237818	JP	04 Dece 2000 (04.12.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

S. Mandallaz

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Setsuko
Mayama, Hayashi & Mayama
Sakurai Building 4th Floor
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2001 (01.03.01)		
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/05711	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	
		Priority date (day/month/year) 25 August 1999 (25.08.99)
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CA,EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 01 March 2001 (01.03.01) under No. WO 01/14587

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MAYAMA, Setsuko
Mayama, Hayashi & Mayama
Sakurai Building 4th Floor
4-4, Chuorinkan 3-chome
Yamato-shi
Kanagawa 242-0007
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 11 December 2001 (11.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference FP00-004PCT	
International application No. PCT/JP00/05711	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY et al	

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

JP

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Eliott PERETTI Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

REC'D 09 MAR 2001

WIPO

PCT

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 FP00-004PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/05711	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 25.08.99	
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C12Q1/68, 1/04, C12N15/11 // (C12N15/11, C12R1:01)			
出願人 (氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国			

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 6 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☒ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☒ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.08.00	国際予備審査報告を作成した日 22.02.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内 田 俊 生	4 B	8 2 1 4
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

IV. 発明の単一性の欠如

1. 請求の範囲の減縮又は追加手数料の納付の求めに対して、出願人は、

- ☐ 請求の範囲を減縮した。
- ☒ 追加手数料を納付した。
- ☐ 追加手数料の納付と共に異議を申立てた。
- ☐ 請求の範囲の減縮も、追加手数料の納付もしなかった。

2 ☐ 国際予備審査機関は、次の理由により発明の単一性の要件を満たしていないと判断したが、PCT規則68.1の規定に従い、請求の範囲の減縮及び追加手数料の納付を出願人に求めないこととした。

3. 国際予備審査機関は、PCT規則13.1、13.2及び13.3に規定する発明の単一性を次のように判断する。

- ☐ 満足する。
- ☒ 以下の理由により満足しない。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。

そこで、本件国際出願の発明の単一性について検討する。

請求の範囲1-10の発明に共通する事項は「工程1)~4)を含む自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法」であるのに対し、請求の範囲11-23の発明に共通する事項は「*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌」であるから、請求の範囲1-10の発明と請求の範囲11-23の発明との間には、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」は存在しない。なお、請求の範囲5の発明は「石油を分解する微生物」に関連するものではあるが、「石油を分解する微生物」は本国際出願時に公知であったから、請求の範囲5の発明と請求の範囲11-23の発明の間にも、同「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

そうすると、請求の範囲には、①請求の範囲1-10の発明、及び、②請求の範囲11-23の発明、の2発明が包含されている。

4. したがって、この国際予備審査報告書を作成するに際して、国際出願の次の部分を、国際予備審査の対象にした。

- ☒ すべての部分
- ☐ 請求の範囲 _____ に関する部分

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-23	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-10, 12-23	有
	請求の範囲	11	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-10, 12-23	有
	請求の範囲	11	無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: JP, 10-155498, A (三井造船株式会社)
16.6月.1998 (16.06.98), (ファミリーなし)
- 文献2: GEISELBRECHT, Allison D. et al.,
Applied and Environmental Microbiology, December, 1998, Volume 64,
Number 12, pages 4703-4710
- 文献3: DYKSTERHOUSE, Sheryl E. et al.,
International Journal of Systematic Bacteriology, January, 1995,
Volume 45, Number 1, pages 116-123
- 文献4: GEISELBRECHT, Allison D. et al.,
Applied and Environmental Microbiology, September, 1996,
Volume 62, Number 9, pages 3344-3349

請求の範囲 1-10

請求の範囲 1-10に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献1に対して、進歩性を有する。

文献1には、特定機能である汚水の生物処理に使用し得る微生物を段階希釈し、該微生物が増殖し得る条件で培養を行った後、増殖した該微生物をカウントし、該微生物の出現率(優占度に相当)を計測する方法が記載されている。しかし、この方法における特定機能微生物は既知のバチルス属細菌であって、この方法は未知の特定機能微生物の検出・定量のために使用されるものではないし、この方法をそのような目的で使用することは当該技術分野の専門家にとって自明のものでもない。

請求の範囲 11

請求の範囲 11に記載の発明は、国際調査報告で引用した文献2-4により、進歩性を有しない。

文献2-4には、*Cycloclasticus*属の微生物が記載されているところ、文献2に記載された微生物の16S rDNA配列であるAF093002, AF093003, AF093004の配列、文献3に記載された微生物の16S rDNA配列であるU12624, L34955の配列、及び、文献4に記載された微生物の16S rDNA配列であるU57920の配列は、いずれも配列番号1-4の16S rDNAに対して高い相同性(93%以上)を有するものである。ところで、一般に、rDNAやrRNAは生物の分類にも使用されるものであって、これらの配列が類似していれば、対象としている生物は類似している(例えば、同じ属に属する)ものと判断され、逆

VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 2 2, 2 3 に記載の発明には、配列番号 1 の塩基配列との相同性により *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定する方法が包含されている。しかし、明細書には、*Cycloclasticus* 属の微生物であって石油分解活性を有していた特定の微生物において、その 16S rDNA 配列が配列番号 1 の塩基配列を有していたことは記載されているものの、16S rDNA 配列が配列番号 1 の塩基配列であれば必ずその微生物は石油分解活性を有するということは記載されていない。そして、16S rDNA の塩基配列と石油分解活性との間には直接の関係は存在しないから、明細書には、配列番号 1 の塩基配列との相同性により、どのようにして石油分解細菌を同定するのかが記載されていないと言える。そうすると、請求の範囲 2 2, 2 3 は、明細書により十分な裏付けをされていないものである。

補充欄 (いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること)

第 V.2. 欄の続き

に、rDNA等の配列をキーとして、分類学的に類似の微生物をスクリーニングすることは、当該技術分野の専門家にとって周知・慣用の技術である。

そうすると、文献2-4に記載されたrDNAの塩基配列(具体的な配列は、データベースから入手できる)に基づいて、プローブやプライマーを作成しそれを使用することにより、文献2-4に記載の微生物と分類学的に類似する微生物の16S rDNA配列である配列番号1-4の塩基配列を取得することは、当該技術分野の専門家にとって自明である。

請求の範囲12-23

請求の範囲12-23に記載の発明は、文献2-4に対して、進歩性を有する。

文献2-4には、*Cycloclasticus*属に属し芳香族炭化水素を分解する細菌及びその16S rDNAが記載されているが、これらの細菌が石油を分解し得るものであることは記載されておらず、かつ、このことは当該技術分野の専門家にとって自明のものでもない。したがって、配列番号1-4の塩基配列又はその一部を有するプローブを用いて*Cycloclasticus*属の石油分解細菌を検出・定量・スクリーニング・同定することも、当該技術分野の専門家にとって自明ではない。

請求の範囲11

請求の範囲11に記載の発明は、産業上の利用可能性を有しない。

明細書には、*Cycloclasticus*属の微生物であって石油分解活性を有していた特定の微生物において、その16S rDNA配列が配列番号1-4の塩基配列を有していたことは記載されているものの、16S rDNA配列が配列番号1-4の塩基配列であれば必ずその微生物は石油分解活性を有するということは記載されていない。そして、16S rDNAの塩基配列と石油分解活性との間には直接の関係は存在しないから、配列番号1-4の塩基配列を使用しても石油分解活性を有する微生物が同定等できるとはいえない。また、単に*Cycloclasticus*属の微生物を同定できるというだけでは、使用した16S rDNA配列が産業上利用可能であるとはいえない。

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 3 月 1 日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/14587 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, 1/04,
C12N 15/11 // (C12N 15/11, C12R 1:01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05711

(22) 国際出願日: 2000 年 8 月 24 日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/237818 1999 年 8 月 25 日 (25.08.1999) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 工業技術
院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SEC-
RETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE
AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千
代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo (JP). 西松建設株
式会社 (NISHIMATSU CONSTRUCTION CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒105-8401 東京都港区虎ノ門1丁目20番10
号 Tokyo (JP). 株式会社 エヌワイケイ輸送技術研究
所 (NYK LOGISTICS TECHNOLOGY INSTITUTE
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒235-0033 神奈川県横浜市磯子
区杉田5丁目32番84号 Kanagawa (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丸山明彦

(MARUYAMA, Akihiko) [JP/JP]. 東原孝規 (HI-
GASHIHARA, Takanori) [JP/JP]; 〒305-8566 茨城
県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工
業技術研究所内 Ibaraki (JP). 石渡寛之 (ISHIWATA,
Hiroyuki) [JP/JP]; 〒105-8401 東京都港区虎ノ門1丁
目20番10号 西松建設株式会社内 Tokyo (JP). 藤田恒
美 (FUJITA, Tsunemi) [JP/JP]; 〒235-0033 神奈川県横
浜市磯子区杉田5丁目32番84号 株式会社 エヌワイ
ケイ輸送技術研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士 間山世津子, 外(MAYAMA, Setsuko
et al.); 〒242-0007 神奈川県大和市中央林間3丁目4
番4号 サクライビル4階 間山・林合同技術特許事務
所 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF DETECTING AND QUANTITATING MICROORGANISM HAVING SPECIFIC FUNCTION AND ITS
GENE FROM NATURAL ENVIRONMENT, NOVEL 16SrRNA GENE DATA AND PROBES

(54) 発明の名称: 自然環境からの特定機能微生物およびその遺伝子の検出・定量方法、新規16SrRNA遺伝子情報お
よびプローブ

(57) Abstract: A method of detecting and quantitating a microorganism having a specific function and its gene from natural environ-
ment which involves: 1) the step of estimating the priority of the microorganism having a specific function in the natural environment;
2) the step of amplifying specific gene domains of the microorganism having a specific function in a liquid culture medium of the
highest dilution ratio at which the proliferation of the microorganism is judged as positive, followed by cloning; 3) examining the
difference among the gene domains thus cloned and determining the base sequences thereof; and 4) identifying the microorganism
having a specific function inhabiting in the natural environment from the base sequence data thus determined. 16SrDNAs having
a base sequence represented by any of SEQ ID NOS:1 to 4. RNA or DNA probes of 10 to 50 bp in size which have a part of a
base sequence represented by any of SEQ ID NOS:1 to 4 and are hybridizable specifically with a petroleum-digesting bacterium
belonging to the genus *Cycloclostridium*.

[続葉有]

WO 01/14587 A1



(57) 要約:

1) 自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物の特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む、自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法。配列番号1～4のいずれかの塩基配列を有する16S rDNA。配列番号1～4のいずれかの塩基配列の一部を有し、*Cycloclasticus*属の石油分解細菌と特異的にハイブリダイズする、塩基長10～50 bpのRNAまたはDNAプローブおよびその利用法。

明 細 書

自然環境からの特定機能微生物およびその遺伝子の検出・定量方法、新規 16S rRNA 遺伝子情報およびプローブ

技術分野

本発明は、自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出・定量する方法、新規16S rRNA遺伝子情報およびその利用に関する。

背景技術

海洋中には石油を分解する微生物が生息し、石油流出事故のあった油濁海域ではその微生物の活動により石油が分解され、時間とともに自然浄化されていく。これまで、石油の自然浄化を左右する物理化学的要因の解明を通し、様々な処理手法や処理技術が開発されてきている（R.P.J. Swannell, K. Lee and M. Mcdonagh, Microbiol. Rev., 60: 342-365, 1996）が、自然浄化の担い手である微生物群集の構成や群集変動に関する解明はほとんど行われていない。そのため、処理技術の有効性やその普遍性を評価することが困難な状況にある。また、培養条件下で効率的に石油分解を行う微生物を微生物製剤として汚染海域に導入し浄化を促進しようという試みもあるが、人為的に導入した微生物製剤の自然界における安全性や有効性についての評価は十分に行われていない。

石油や有害化学物質汚染現場の分解微生物をモニタリングするためには、培養法による分解微生物の計数、並びに現場試料からの集積培養法や平板培養法による微生物の分離・培養、および分離した微生物の分解性を評価するための培養物中の石油の分析などに多くの労力と時間を要する。また、きわめて重要なことは、自然界に生息する微生物の内、現在上記のように分離・培養できる微生物は 1% 以下でしかないということである。従って、上記のように従来の分離・培養法に依存した石油分解細菌や有害化学物質分解細菌のモニタリング法のみでは、現場微生物の 1% 程度を対象としたモニタリングしかできず、汚染現場で石油や有害化学物質の分解に関わる大半の難分離微生物に対するモニタリングはできない。

また、最近石油以外にPCB、トリクロロエチレンなどの有害化学物質による土壌・地下水汚染の浄化に、それらの有害物質を分解する微生物を利用したバイオレメディエーションの開発が進められている（児玉 徹ら編：地球をまもる小さな生き物たち—環境微生物とバイオレメディエーション—、技報堂出版、1995、八木修身ら：バイオレメディエーションの水域環境への適応、（日本水産学会監修（石田祐三郎、日野明德編）：生物機能による環境修復—水産における Bioremediation は可能か—、恒星社厚生閣、p. 9- 21, 1996）。しかし、バイオレメディエーション過程における微生物群集や分解微生物の挙動などについてはほとんど解明されていない。

本発明は、石油や有害化学物質などで汚染された現場環境で優占する石油や有害化学物質などの汚染物質分解微生物を解明する手法、およびそれらの微生物を利用した環境浄化・修復技術の開発を進める上で不可欠な石油や有害物質等の汚染物質分解微生物、並びに自然環境中から酵素等有用物質生産微生物を検出するための材料および方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、マイクロプレート MPN、ダイレクト PCR およびシーケンシングを組み合わせた手法により、石油汚染現場の試料から遺伝子レベルで石油分解細菌を検出・定量し、かつ顕微鏡を用いた直接計数法によりその数を全菌数と比較して優占度を把握するという新規なモニタリング手法を開発した。この手法は、石油分解細菌の分離を必要としないこと、また分離が困難な微生物も含めて石油分解細菌のモニタリングが可能なこと等から、従来の問題を克服することができる。さらに、本発明の上記手法は、平板培養分離法によらず分子・細胞レベルで、有害化学物質等の汚染物質を分解する微生物や酵素等の有用物質生産微生物などの特定機能微生物の検出・定量を行い、それら特定機能微生物の環境中での優占度や挙動等の解析に応用できる新規モニタリング手法や新規有用微生物のスクリーニング手法として有用である。

また、本発明者らは、上記の手法により、1997年1月2日の日本海におけるナホトカ号石油流出事故後の同年1月15日に油濁海水

中に優占していた微生物の16S rDNA領域の塩基配列を決定することで、現場環境で優占していた石油分解細菌の16S rDNAの塩基配列情報の分子系統学的な特徴を明らかにした。また、培養法によらず分子・細胞レベルにおいて微生物検出を行うため、得られた塩基配列情報に基づいて前記微生物のみを特異的に標識可能なDNAプローブの開発にも成功した。

本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明の要旨は、以下の通りである。

(1) 自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法であって、以下の工程：

1) 自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行った後、増殖した特定機能微生物の計数を行う一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行い、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物数の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、

2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出し、該 DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、

3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および

4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む前記方法。

(2) 特定機能微生物および全従属栄養微生物の計数を MPN 法により行い、全菌数の計数を直接顕微鏡計数法により行い、特定機能微生物の増殖を顕微鏡観察により判定する (1) 記載の方法。

(3) 特定機能微生物が特定の化学物質を分解する微生物である (1) または (2) 記載の方法。

- (4) 特定の化学物質が有害化学物質である(3)記載の方法。
- (5) 特定の化学物質が石油および石油成分である(3)記載の方法。
- (6) (1)または(2)記載の方法を用いて、自然環境に優占している微生物の遷移を解析することにより、自然環境の微生物群集機能を評価する方法。
- (7) (1)または(2)記載の方法を用いて、汚染環境を解析・評価する方法。
- (8) (3)または(4)記載の方法を用いて、有害化学物質汚染環境を解析・評価する方法。
- (9) (5)記載の方法を用いて、油濁環境を解析・評価する方法。
- (10) 特定機能微生物が有用酵素生産微生物である(1)または(2)記載の方法。
- (11) 配列番号1～4のいずれかの塩基配列を有する16S rDNA。
- (12) 配列番号1～4のいずれかの塩基配列の一部を有し、*Cycloclasticus*属の石油分解細菌と特異的にハイブリダイズしうる、塩基長10～50 bpのRNAまたはDNAプローブ。
- (13) 配列番号1～4のいずれかの塩基配列の一部が配列番号5、6および7の塩基配列からなる群より選択される(12)記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (14) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌を検出または定量するための(12)または(13)に記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (15) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌が*Cycloclasticus pugetii*またはその近縁種である(14)記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (16) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌をスクリーニングするための(12)または(13)に記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (17) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌が*Cycloclasticus pugetii*またはその近縁種である(16)記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (18) (12)または(13)記載のRNAまたはDNAプローブを用いて、

Cycloclasticus 属の石油分解細菌を検出または定量する方法。

(19) *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である (18) 記載の方法。

(20) (12) または (13) 記載の RNA または DNA プローブを用いて、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌をスクリーニングする方法。

(21) *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である (20) 記載の方法。

(22) 配列番号 1~4 のいずれかの塩基配列との相同性、または (12) または (13) 記載の RNA または DNA プローブを用いた DNA/DNA または DNA/RNA ハイブリダイゼーションにより *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定する方法。

(23) *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である (22) 記載の方法。

本発明は、1) 自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行った後、増殖した特定機能微生物の計数を行う一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行い、全菌数および/または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物数の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出し、該 DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む、自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法を提供する。この方法において全菌数の計数を行うことは、対象とする自然環境試料中での微生物群集全体の大きさ(母集団の大きさ)を知る上で不可欠なものであり、その中での特定機能微生物の優占度を見積もる工程において大変重要な意味をもつ。

ここで、「自然環境」とは、地球上の生物圏を意味し、海洋や湖沼、河川、排水処理環境等の水圏、土壌や陸上地下、海底地下等の地圏、地球表層のような気

圏等、微生物が生息している地球上全ての環境をいう。

「特定機能微生物」とは、自然環境に生息する微生物の中で、その機能が培養や遺伝子解析により特定化された微生物のことをいい、例えば、石油、トクロロエチレン、PCB、ダイオキシン等有機塩素化合物、環境ホルモン物質（アルキルフェノール、ビスフェノール A、フタル酸エステル等）、有機水銀、シアン化合物、有機スズ化合物などの有害化学物質を分解する微生物、およびキチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、リグニン等の分解酵素や各種抗生物質等の有用物質を生産する微生物などを例示することができる。

「特定機能微生物の遺伝子」とは、上記特定機能微生物が保有する遺伝情報のことをいい、たとえばその機能の発現に関与する遺伝子や、リボソーマル RNA 遺伝子（rDNA）やトポイソメラーゼ遺伝子等の分類学的な基準遺伝子の中でその特定機能微生物を特定化しうる塩基配列情報などを例示することができる。

「特定機能微生物およびその遺伝子の検出および定量」とは、上記特定機能微生物やその遺伝子を、特異的に検出し定量（計数）することを言う。特定機能微生物を検出・定量する場合、培養に用いる基質利用能の有無に基づき増殖の有無として特異的な検出が可能であり、培養前に試料を段階希釈しておくことにより計数（定量）が可能である。また、この計数を可能とした培養液より微生物の遺伝子や細胞を取り出し解析することにより、定性的な解析（微生物の同定や特定遺伝子の検出）が可能となる。

すなわち、遺伝子を抽出してシークエンサーによりその塩基配列を解読し、分子系統解析や相同性解析等を行うことにより、その微生物の同定や特定遺伝子の検出を行うことができる。このような段階希釈選別・培養を行うことにより、通常の PCR 時に問題となる増幅エラーを低減させたより正確で定量的な遺伝子解析が可能となる。また、その特定機能微生物に特異的な DNA/RNA プローブや抗体等を用いることにより、ハイブリダイゼーション手法や抗体に標識した物質（蛍光物質や酵素等）を仲介させた検出手法等を用い、細胞レベルや分子レベル（細胞を破碎して試料調製した場合）でその存在を検出することができる。したがって、これらの定性的な解析過程で、試料中にその遺伝子塩基配列や抗原等の標的物質の存在が確認された場合、その存在は上記特定機能微生物の計数の場合と同

様に、標的物質を保有する微生物数として計数し定量化することができる。

上記の方法において、まず、自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行う。

「自然環境から採取した微生物含有試料」とは、微生物が生息する地球上の生物圏から採取した試料をいい、例えば、大気、海洋、湖沼、河川、土壌、陸上地下、海底地下などから採取した水、土壌、底泥、岩石などの試料、および微生物が共存、共生している微細藻類、大型藻類、動物プランクトン、各種動植物などの試料を例示できる。

微生物含有試料の段階希釈は、例えば、以下のように行うことができる。まず、微生物がその他の生物と共存、共生していたり微生物が大きな集塊を形成していることが想定される場合には、段階希釈の前に用いる試料（試料が個体の場合は滅菌した初期希釈液）中において、たとえば数分間のボルテックスミキサー処理や1分程度の超音波洗浄処理等を行い、顕微鏡観察により微生物細胞の分散を確認しながらできるだけ試料中の微生物を遊離、分散させておく。次に、その微生物含有試料を滅菌希釈液で段階希釈する。たとえば、10 ml スケールで10 倍の段階希釈を行う場合、滅菌希釈液（例えば、海洋由来の試料では人工海水や天然海水、淡水由来試料では蒸留水等、動植物由来試料では生理食塩水等、この他それぞれの培養に用いる培養液）を滅菌した試験管等に 9 ml ずつ分注し、その試験管に微生物含有試料 1 ml を加え、よく振とう・攪拌する。これを一次希釈試料液（希釈倍率 10^1 倍、 10^{-1} 試料）とする。ついで、この一次希釈試料液 1 ml を新たな滅菌希釈液 9 ml に加えて、十分攪拌・振とうし、これを二次希釈試料液（希釈倍率 10^2 倍、 10^{-2} 試料）とする。以下、この操作を n 回繰り返すことにより、 n 次希釈試料液（希釈倍率： 10^n 倍、 10^{-n} 試料）を得ることができる。このように、10 倍段階希釈の場合、試料液と希釈液の比率は 1:9 であればよい。

各段階希釈物は、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養される。例えば、特定機能微生物が石油または有害化学物質を分解する微生物である場合には、石油または有害化学物質を炭素源とする培地で各段階希釈物を培養する。ここで、「培養」とは、段階希釈物中に存在する微生物を生育・増殖させることをいい、培養は、温度、湿度、pH、栄養源の種類および量等の培地組成などが制御された

状態で行われるとよい。

培養後、増殖した特定機能微生物の計数を行う。特定機能微生物の計数は、例えば、液体培地を用いる MPN 法（清水 潮：MPN 法による一般従属栄養細菌数の測定。沿岸環境調査マニュアル II－水質・微生物篇。日本海洋学会編、恒星社厚生閣、p.281、1990）および/または寒天やシリカゲル等で固化させた固体培地を用いる平板計数法により行うことができる。ここで、特定機能微生物として一般の好気性微生物を対象とする場合には、ガス置換をしない通常の方法で培地調製し培養すればよい。また、培地およびそれを入れる試験管や容器中より空気を窒素ガス等で置換し、酸素混入のない条件で培養することにより、各種嫌気性微生物を計数の対象にすることも可能である。このうち、MPN 法は、検出感度が他の方法より高いので好ましい。

具体的には、培地 9 ml を含む培養試験管を上記に示した試料の各希釈段階ごとに 3 本または 5 本ずつ準備しておく。試料中の微生物数により 4～6 段階程度の希釈試料を準備する。微生物数が多いと見込まれる場合には、事前に希釈した試料を培養計数に用いてもよい。MPN 法の場合、希釈段階は 10 倍となる。この培養試験管に、前記微生物含有試料の段階希釈で調製した各希釈段階の試料を 3 本または 5 本の培養試験管にそれぞれ 1 ml ずつ加える。この試験管を微生物の至適な培養温度、例えば 20℃ で一定時間培養し、培地の濁りなどで菌の増殖を判定する。得られた結果から、MPN 計数表（3 本法または 5 本法）によって試料中の微生物数を算出する。

ここで、石油分解菌や有害化学物質分解菌を特定機能微生物として MPN 計数する場合、唯一の炭素源として石油や有害化学物質を上記培地に加えることによって計数することができる。また、キチナーゼ等有用酵素生産微生物の場合、培地の炭素源を目的とする酵素の基質（キチナーゼの場合はキチン等）にすることによって計数できる。

上記において、微生物の増殖の判定には、増殖に伴い生じる菌体の濁りの有無で判定するのがふつうであるが、増殖に伴う培地組成の変化（たとえば、pH や基質濃度の減少、生成物の増大等）で判定することもできる。また、希釈倍率の高い試料で、用いる培地組成や培養条件等により菌体増殖の程度や培地組成の変



化が乏しい場合には、試料中の菌体の有無を直接顕微鏡観察して判定することが望ましい。直接顕微鏡観察は、直接顕微鏡計数法（後述）に準拠して行えばよい。ただし、この場合、試料中の菌体の有無の判定を目的としており、試料を添加しない場合のコントロール値より有為な細胞数の検出が確認できればよい。

上記において、特定の基質を用いて増殖が陽性と判定された試料の内、最も希釈倍率の高い試料については、その希釈直後、すなわち培養前に存在していた特定機能微生物の細胞数は、理論的には1～9細胞、種類数も1～9種類となる。したがって、通常の寒天平板を用いた培養手法での分離が不可能であっても、この増殖陽性と判定された最も希釈倍率の高い液体培養試料には、増殖によりそれ以上の数の微生物が存在していることになり、これを対象としてDNAレベルでの解析を行う場合、PCR時のエラーの問題が軽減できるという利点がある。実際には、遺伝子解析手法（後述）を用いることにより、その種類を高い精度で効率的に推定することが可能となり、採取した原試料中にいた微生物の細胞数とその種類に関する情報が一度に得られるという利点がある。

上記の段階希釈、培養および特定機能微生物の計数の一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行う。

「微生物含有試料中の全菌数」とは、試料中に存在する全微生物細胞数のことで、実際には細胞密度（単位容量あたりの細胞数）として表す。

全菌数の計数は、例えば、ホルマリン等で細胞固定した試料を染色せずに血球計数板等を用いてそのまま計数したり、各種DNA蛍光染色剤を用いて染色した細胞をフローサイトメータ計数したりすることもできるが、より正確には直接顕微鏡計数法により行うことができる。

このうち、直接顕微鏡計数法は、環境微生物の全菌数計数法として最も信頼性の高い手法であり、これに用いるDNA特異的染色剤によりアクリジンオレンジ法（J.E. Hobbie et al., Appl. Environ. Microbiol., 33:1225-1228, 1977）やDAPI法（K.G. Porter and Y.S. Feig, Limnol. Oceanogr., 25: 943-948, 1980）等がある。細胞を染色しない場合には、環境試料中に多数存在する微生物以外の粒子を計数してしまう危険性が高く、また染色して機械的に計数する場合でも、微生物



細胞を直接認識しないため擬似染色された粒子を計数してしまう可能性が高い。したがって、簡便性と信頼性の点で、直接顕微鏡計数法を用いることが最も好ましい。

以下に、直接顕微鏡計数法具体的な作業例を示す。試料を採取後、直ちに中性ホルマリン（最終濃度 2%程度）を加えて固定し冷蔵庫保存する。それを小分けした試料に対し、DAPI 溶液（4',6-diamidino-2-phenylindole）を終濃度 0.5 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$ で添加し 5 分間程度細胞を染色する。次に、染色した微生物細胞を、黒色色素で染色された孔径 0.2 μm の Nuclepore フィルターで濾過し、フィルター上に細胞を捕集する。このフィルターをピンセットで取り外し、あらかじめ 1 滴の蛍光顕微鏡用エマルジョンオイルを落としたスライドグラス上に濾過面を上にしたままのせる。次いで、1 滴のエマルジョンオイルをこのフィルター上に落とし、カバーグラスをかぶせる。こうして得られたプレパラート上に、さらに 1 滴のエマルジョンオイルを置き、油浸で落射型蛍光顕微鏡下で観察し計数する。全菌数は下記の計算から求める。

全菌数 (cells/ml) = (1 方形中の平均細菌数 \times フィルター上の濾過面積) / (試料水中の濾過量 (ml) \times 方形の面積)

ここで方形とは、接眼レンズ中に挿入したマイクロメータを通して観察される正方形のグリッド視野の大きさのことを意味する。

「従属栄養微生物」とは、増殖に際し、他の生物がつくった有機化合物を細胞構成成分として必須とする微生物をいう。

全従属栄養微生物の計数は、例えば、固体培地を用いる寒天平板法や液体培地を用いる MPN 法により行うことができる。特定機能微生物の計数を MPN 法で行う場合には、全従属栄養微生物の計数も MPN 法で行うことが好ましい。一般の自然環境水試料を対象とした従属栄養細菌計数の場合、MPN 法では平板法よりも通常多くの生菌数が数えられることから、検出感度の点でも平板法より好ましい。

具体的に、全従属栄養微生物を MPN 法で計数する場合、培地として従属栄養

微生物用培地（たとえば実施例 1 に示した 1/2TZ 培地）を用い、前述のように一定時間培養し、培地の濁り等で菌の増殖を判定し、得られた結果から MPN 計数表によって試料中の全従属栄養微生物数を算出するという手順で行うことができる。

そして、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する。具体的には、同じ自然環境から同時に採取した同一試料を測定対象として用い、直接顕微鏡計数手法によって得られた全菌数を分母とし、MPN 法等によって得られた特定機能微生物数を分子とすることにより、その優占度を見積もる。この場合、理論的に特定機能微生物数は個々の細胞を認識して計数した全菌数を上回ることはなく、常に 0～100% の幅で優占度を見積もることが可能である。また、全菌数に代え、MPN 法等によって得られた全従属栄養細菌数を分母におくことにより、全従属栄養細菌に占める特定機能微生物の割合を求めることもできる。さらに、同じ自然環境から同時に複数の試料を採取し、それぞれ同一試料を用いて上記測定を行い、平均値や標準偏差を求める等の統計処理を行うことにより、対象とした自然環境中での特定機能微生物の優占度の信頼性を向上させることができる。

また、特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出する。

微生物からの DNA の抽出は、公知の方法（例えば、M. G. Murray and W. F. Thompson, *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325, 1980 に記載されている方法）により行うことができる。

抽出した DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする。

「特定の遺伝子領域」としては、16S rDNA の他、5S, 18S, 23S rDNA 等のリボゾーマル RNA 遺伝子、トポイソメラーゼ遺伝子、エロンゲーションファクター遺伝子、二酸化炭素固定酵素遺伝子およびその微生物の基質特異性に関与する酵素等の特定機能遺伝子などを例示することができる。

特定の遺伝子領域の増幅およびクローニングは、公知の方法（例えば、増幅については J. Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 14.1-14.35, 1989、

クローニングについては D. Kaufman and G. Evans, BioTechniques, 9: 304-406, 1990 に記載されている方法) により行うことができる。実際には、無作為に数十クローン試料を選抜し、それら試料中に目的とする特定の遺伝子領域の全長が含まれているかどうかをゲル電気泳動解析により確認する。たとえば、増幅した特定遺伝子領域の全長が 2 kbp である場合、ゲル電気泳動上でも 2 kbp 近辺の位置にバンドが形成され確認できる。

次いで、クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する。

具体的には、上記により獲得したクローン試料、望ましくは 30 以上の試料を、EcoRI や ApaI、XbaI 等いくつかの制限酵素を用いて断片化した後、ゲル電気泳動解析によりこれらの制限酵素断片長の多型性 (RFLP) パターンの異同を調べる。ここで、異なる RFLP パターンを示した試料は異なる塩基配列情報を有すると考えられることから、この工程により、クローン試料を大まかにグループ化するとともに可能な限り同一クローン試料を除外することで試料を選別し、DNA シークエンサーを用いてその塩基配列を決定する。また、この RFLP パターン解析に基づく試料選別のみならず、DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション解析等によっても、その異同 (この場合、プローブが標的とする塩基配列の相同性) を事前に調べることができ、違いの大きい (相同性の低い) 試料を塩基配列解析の対象として選別することができる。前述のように、本発明の手法では、これらの選別過程においては、理論上最大でも 9 種のグループが出現するのみである。ここで、もし 9 種以上のクローン試料が出現した場合には、クローニング過程で用いた微生物が保有する酵素による不可抗力的な塩基置換の可能性も否定できないが、その違いが多岐にわたる場合には、段階希釈 - 培養計数時における判定ミスの可能性が高いと判断でき、さらにより希釈度の高い試料を対象に優占的な微生物の検出を行うことができる。

最後に、決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する。具体的には、GeneBank や EMBL、DDBJ 等のデータベースより各分類群にまたがるいくつかの代表種の塩基配列情報を入手し、Clustal W (version 1.7, Des Higgins, 1997) や Se-Al (version 1, Andrew Rambaut, 1996) のようなプログラムを用いて多重アラインメント処理 (解析対象とする複数の塩基配列

間で塩基の挿入や欠損箇所を削除し、相互に置換の有無のみを示す配列の集合体とするような再配列化処理)をした後、下記に示す分子系統解析や相同性解析を行い、その分子系統上の近縁性や塩基配列の相同性から既存種のどれに近いかを判定し同定する。

同定される微生物は、自然環境から採取した試料中に存在するものであるが、前述したように、希釈倍率の高い試料で検出・同定されるものであれば、その自然環境で優占していた微生物である確率が非常に高い。さらに、自然環境から採取した同一試料について、前述した全菌数や従属栄養細菌数を測定しておけば、より科学的にその優占度を%表記することが可能となる。例えば、石油汚染現場から採取した試料の場合には、上記の方法により、現場に優占する石油分解細菌を同定し、かつ全菌数や全従属栄養細菌数との比較により、その優占度を%表記することができる。

ここで「同定」とは、培養可能な微生物を対象とした現代的な分類・同定の工程の中で、塩基配列情報に基づく分子系統解析の工程のみを指し、解析対象とする微生物の遺伝子について、類縁微生物種のそれと分子系統学上の同一性または近縁性を証明するという行為である。分子系統解析手法としては、近隣結合法(NJ法: N. Saitou and M. Nei, *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425, 1987) および/または最節約法(MP法: W.M. Fitch, *Syst. Zool.*, 20: 406-416, 1971)、最ゆう法(ML法: J. Felsenstein, *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376, 1981)を用いることができる。実際には、NJ法による解析はClustal W (version 1.7, Des Higgins, 1997) や PHYLIP (J. Felsenstein, version 3.57c, 1995) 等、MP解析はPAUP* (D. L. Swofford, test version 4.0d63)等、ML解析はMOLPHY (version 2.3b; J. Adachi and M. Hasegawa, *Computer science monographs*, no. 28. Tokyo Institute of Statistical Mathematics, 1996) 等のソフトウェアを用いて実施することができる。これらの分子系統解析の結果、入手したクローンのいくつかが系統樹上で既存種とは明確に異なる操作上の分類ユニット (Operational Taxonomic Unit) の一群(クラスター)を形成した場合(経験的な目安として、その分岐の再現性確率を示すブートストラップ値が70~80%以下の場合)、それは分子系統学上新規グループと判断され、分類学上でも新種の可能性が高いと考えることができる。

本発明の上記の方法においては、さらに、この同定の精度を向上させるため、相同性解析などの工程を含むことが好ましい。この相同性解析は、対象とする塩基配列領域において、個々に塩基配列が決定され相互に比較可能な領域、望ましくはその遺伝子の全領域の塩基配列の数を分母とし、その中で塩基配列が完全一致するものの数を分子として%計算する方法により、たとえば Genentyx-MAC 8.0 解析ソフト (Genetic Information Processing Software 社製) を用いて解析できる。特に、16S rDNA の全領域を対象とし、その相同性が 97% 以上である場合、それらを互いに同一種と推定することが国際基準として提唱されている (E. Stackebrandt and B.M. Goebel, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849, 1994) という点で有利である。一方、分子系統解析および相同性解析の上から同一種と推定される場合においても、本工程により得られる相同性が 100% を下回った場合、同一種の中での塩基配列の多様性の幅や亜種の存在を示唆するものとなる。これは、入手した新しい塩基配列情報やデータベース上の既存情報から種特異的塩基配列を選抜し、そのプローブを設計するといった派生的な作業を行う上で、重要な参照データになり得ることを意味する。

特定機能微生物は特定の化学物質を分解する微生物であってもよく、特定の化学物質としては、石油および石油成分、トリクロロエチレン、PCB、ダイオキシンなどの有機塩素化合物、環境ホルモン物質 (洗剤に使用されているアルキルフェノール、主にポリカーボネート樹脂等の原料ビスフェノール A、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル)、有機水銀、シアン化合物、有機スズ化合物などの有害化学物質を例示することができる。石油 (広義には、一般に原油と呼ばれる。) 中に存在する主要な炭化水素は、化学構造によって大きく飽和炭化水素と芳香族炭化水素に分類される。前者はさらに n-パラフィンと分枝パラフィン等のパラフィン類と単環と多環のシクロパラフィンを含むシクロパラフィン (ナフテン) 類に分けられる。後者は単環と多環の芳香族炭化水素に分けられる (東原孝規、月刊海洋、30 巻、10 号、613-621、1998)。一般にこのような原油中に含まれる炭化水素を分解する微生物を石油分解微生物という (J.G. Leahy and R.R. Colwell, *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315, 1990, R.M. Atlas and R. Bartha, *Adv. Microbiol. Ecol.*, 12: 287-338, 1992)。

また、特定機能微生物は、特定の有用酵素生産微生物であってもよく、特定の酵素としては、キチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、リグニン分解酵素などを例示できる。

上記の方法を用いて、自然環境に優占している微生物の遷移を解析することにより、その自然環境の微生物群集機能を評価することができる。ここで、「微生物群集機能」とは、対象とした自然環境中に生息する複数種の微生物により営まれる総体としての機能のことをいう。ここで言う微生物の種類とは、通常のカテゴリー単位である種であることが好ましいが、実験上の機能単位、たとえば PCB 分解菌群という一つの機能単位であってもよい。したがって、特定機能微生物一種のみの機能を微生物群集機能とは呼ばない。また、微生物群集内の異種微生物間の相互作用は、共生と呼べるほどの強い場合やただ存在しているだけの場合が考えられるが、その各々全てを特定することが困難であることから、その試料中に見い出された全ての微生物による総合的な機能のことを微生物群集機能と呼ぶ。

実際には、一種のみで、現在知られている微生物機能の全てを備えた微生物は存在しないことから、そこで見出された微生物たちは栄養物や酸素等の生育に影響を及ぼす諸要因をめぐりそれぞれに固有のニッチ（生態学的地位）をもち、その大多数が相互に弱い連携関係にあるものと考えることができる。この微生物群集機能の存在は、たとえば、滅菌海水を用いた培養条件では良好な増殖を示す微生物でも、同じ海水を滅菌せず自然のまま用いた培養条件では同様の増殖が見られないということからも容易に推定できる。

また、石油の分解をめぐっては、脂肪族炭化水素を分解する微生物や芳香族炭化水素を分解する微生物以外にも、それらの分解中間代謝産物を炭酸ガスまで分解する過程には多くの微生物が関与しており、これらの微生物にビタミン等の微量必須栄養素を供給する微生物等も共存しているものと考えられ、複数種の微生物が協同して石油を無機化、無毒化しているものと考えることができる。この場合、ある分解産物が生育阻害物質になりうる場合には、その分解産物を利用可能な微生物と共存することにより分解効率は上昇するものと考えられ、微生物群集全体として高い分解機能が発現されることになる。

具体的には、前述した方法により微生物群集内の一種または複数種の特定機能

微生物、たとえば好気性の炭化水素分解菌や PCB 分解菌、タンパク質分解菌、グルコース資化性菌等および嫌気性の硫酸還元菌やメタン生成菌等の優占度を調べておき、その経時的な変動を調べることにより、各々の特定機能微生物の遷移を解析することができる。その結果、たとえば、沿岸表層水において、ある時期に硫酸還元菌の優占度が上昇していれば、その時の微生物群集は潜在的に硫酸還元機能が高いと評価できるし、その原因として、試料採取以前に台風や地殻活動等による海底堆積物の巻き上がりや嫌気的な廃水の流入等により、それらが通常の嫌気的な生息環境から移入してきたものと推定することができる。

また、上記の方法を用いて、汚染環境を解析・評価することができる。たとえば、対象とする特定機能微生物が、あるパルプ工場の排水中に特異的に優占する従属栄養細菌である場合、ある時期にその優占度が上昇していれば、その環境はこの排水に汚染されている可能性が高いと判断できるし、その優占度の変化を長期間モニターしその遷移の周期性や季節性を把握していれば、その変化が突発的なものであるかどうか、またその負荷が人為的なものかどうかを評価することができる。

さらに、上記の方法を用いて、有害化学物質汚染環境を解析・評価することができる。たとえば、対象とする特定機能微生物が PCB 分解菌である場合、ある時期にその優占度が上昇していれば、その環境は PCB 汚染されている可能性が高いと判断できるし、その微生物群集は総体として PCB 分解機能が高まっていると判定できる。さらに、その優占度の変化を長期間モニターしその遷移の周期性や季節性を把握していれば、その変化が突発的なものであるかどうか、その負荷が工場排水の流入等人為的なものかどうかを推定することができる。

また、上記の方法を用いて、油濁環境を解析・評価することができる。たとえば、対象とする特定機能微生物が石油成分由来のもの、たとえばテトラデカンやアントラセンの分解菌である場合、ある時期にその優占度が上昇していれば、その環境は石油等で汚染されている可能性が高いと判断できるし、その微生物群集は総体としてその石油成分の分解機能が高まっていると判定できる。さらに、その優占度の変化を長期間モニターしその遷移の周期性や季節性を把握していれば、その変化が突発的なものであるかどうか、その負荷が船舶事故等に起因した人為

的なものかどうかを推定することができる。

また、上記の方法を、有用酵素や抗生物質等の有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニングに応用することもできる。例えば、培地の炭素源としてキチン、脂質、リグニン、セルロース、キシランなどを用いると、それを分解する酵素（キチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼなど）を生産する微生物が増殖して、その遺伝子を検出、定量することができる。また、通常のペプトンおよび酵母抽出物などから構成される培養液等を用いて微生物を増殖させ、その生産物の中に抗生物質等有用物質が含まれているかどうかを調べることにより、有用物質生産微生物の検出、定量を行うことができる。

また、最近では、上記酵素等の有用物質生産遺伝子の塩基配列が解明され、データベースが構築されている。したがって、本方法は、試料中に最も優占している微生物の有する遺伝情報を解明し、その塩基配列と既存の酵素等有用物質生産遺伝子データベース上の塩基配列とを対比させることによって、有用物質の検索を可能にするものである。さらに、目的とする酵素等の有用物質生産遺伝子の塩基配列を有する微生物数を定量的に把握することもできる。これは、自然界から有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニングを行う上できわめて有効である。

従来、これら酵素等の有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニングには、各種の分離源試料から、酵素の基質となるセルロース、キチン等を唯一の炭素源とした培地を用いて、集積培養法や寒天平板法等により、多数の微生物を分離し、さらに分離菌株の有用物質生産性を試験するなど、多大な労力を要した。

以上のように、本発明は、自然環境中の微生物群集の中から、平板分離法での分離が困難な微生物であっても、酵素等有用物質生産遺伝子塩基配列を有する微生物を定量的に検出し解析することを可能にする方法を提供するものである。したがって、本発明は、従来の方法に比べて効率的かつ利便性が大きく、これまで対象とされていなかった平板培養分離が困難な有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニング手法としてもきわめて有益である。

上記の方法により、1997年1月2日に起こった日本海重油流出事故により大量の重油が漂着した福井県三国町沿岸域の表層海水から、配列番号1

～ 4 の塩基配列を有する 16S rDNA の遺伝子情報が得られた。この遺伝子情報から、現場環境に優占していた石油分解細菌は、*Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種であることがわかった。すなわち、後述の実施例に記載のように、上記石油流出事故後の油濁海域における微生物群集の中から、C 重油を唯一の炭素源とした液体培地での MPN 培養計数法により優占していた石油分解細菌を選別し、次いで、選別した石油分解細菌の培養細胞から DNA を抽出し、この DNA を鋳型として適当なプライマー（例えば、16S rDNA の保存領域に対応するプライマー）を用いて PCR を行い、PCR 反応液を電気泳動にかけることにより、配列番号 1 ～ 4 の塩基配列を有する 16S rDNA を得、この 16S rDNA の塩基配列をオートシーケンサーにより決定した。この遺伝情報を用い、前述の分子系統解析や相同性解析を行い、この現場で優占していた石油分解菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種に由来するものと同定した。

配列番号 1 ～ 4 の塩基配列情報に基づいて、種々の用途に適した RNA および DNA プローブを設計することができる。プローブの塩基配列および長さは用途に応じて、適宜選択すればよい。例えば、FISH 法 (fluorescence *in situ* hybridization) により、試料（例えば、石油流出事故後の石油で汚染された区域の海、河川、湖沼などの水）中の *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌を検出または定量したり、多数の微生物群の中から *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌をスクリーニングするためには、配列番号 1 ～ 4 の塩基配列の塩基番号 823 ～ 853 の領域 (*Escherichia coli* の 16S rDNA の塩基配列における 5' 末端からの位置 (ナンバーリングシステム) では、829 ～ 866 の領域) などから選択される領域に対応する塩基長 10 ～ 50 bp、好ましくは塩基長 15 ～ 25 bp のプローブを設計するとよい。一例として以下のプローブを挙げることができる。

(1) 5'-GGAAACCCGCCCAACAGT-3' (Cyclopug829-846*, 18mer) (配列番号 5)

3'-CCTTTGGGCGGGTTGTCA-5'

(2) 5'-TGCACCACTAAGCGGAAACC-3' (Cyclopug847-866*, 20mer) (配列番号6)

3'-ACGTGGTGATTCGCCTTTGG-5'

(3) 5'-GGAAACCCGCCCAACAGTTGCACCACTAAGCGGAAACC-3'
(Cyclopug829-866*, 38mer) (配列番号7)

(なお、* (数字) は *Escherichia coli* の 16S rDNA 塩基配列における 5'末端からの位置 (ナンバーリングシステム) を示す (H.F. Noller and C. R. Woese, Science, 212:403-411, 1981))。

(3) のプローブの塩基配列は、(1) と (2) のプローブの塩基配列が隣接したものであるが、この場合はプローブが自己結合する可能性があるので注意が必要になる。

プローブは、公知の方法、例えば、ホスホルアミド法またはトリエステル法により合成することができる。あるいは、DNA 自動合成機により合成してもよい。

また、プローブは、アイソトープ (^{32}P 、 ^{35}S など)、蛍光色素 (ビオチン/アビジン、ジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン-ローダミン、Fluorescein-isothiocyanate (FITC)、LuciferYellow CH、Rhodamine 123、Acridine orange、Pyronin Y、Ethidium bromide、Propidium iodide、Ethidium homodimer、BOBO-1、POPO-1、TOTO-1、YOYO-1、Carboxyfluorescein diacetate (CFDA)、Fluorescein diacetate (FDA)、Carboxyfluorescein diacetate-acetoxymethylester (CFDA-AM)、5-cyano-2,30ditolyl tetrazolium chloride (CTC)、Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)、Sulforhodamine 101 acid chloride (Texas Red)、Cy3、Cy5、Cy7、2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate (HNPP) など)、ジゴキシゲニン等の抗原物質などで標識するとよい。もし抗原物質で標識した場合には、酵素免疫学的な手法を用い、基質の酵素分解を経て生じる化学発光や蛍光を検出すればよい。

本発明の RNA または DNA プローブを用い、種々のハイブリダイゼーション法 (サザンブロット法、ノーザンブロット法、コロニーハ

イブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、*in situ* ハイブリダイゼーション（例えば、FISH 法）など）により、*Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌を検出または定量したり、スクリーニングすることができる。

本発明の DNA プローブを用いて、石油流出事故現場の海水から石油分解細菌を検出・定量する方法の一例について以下に説明する。石油流出事故現場の海域から海水を採取し、この海水中に存在する微生物をフィルター（孔径 $0.2\mu\text{m}$ ）に固定し、これを蛍光色素等で標識した配列番号 5 の塩基配列を有する DNA プローブとハイブリダイズさせ、プローブを洗い落とした後、蛍光顕微鏡で観察して、DNA プローブとハイブリダイズした細菌（石油分解細菌）の検出または計数を行う。

また、本発明の DNA プローブを用い、コロニーハイブリダイゼーション手法、ドットプロットハイブリダイゼーション手法、フローサイトメトリー法などにより、多数の微生物群の中から *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌をスクリーニングすることができる。

さらに、配列番号 1～4 の塩基配列との相同性、または配列番号 1～4 の塩基配列情報に基づいて設計した RNA または DNA プローブを用いた DNA/DNA または DNA/RNA ハイブリダイゼーションにより、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定することができる。ここで、「同定」とは、配列番号 1～4 のように対象とする遺伝子のほぼ全領域の塩基配列を解析した場合には、その塩基配列間での相同性の計算を意味する。また、上記のようにして設計した分類学的に特異的な塩基配列（この場合、*Cycloclasticus* 属の微生物で、特に *Cycloclasticus pugetii* という種およびその近縁種に特異的な塩基配列）をもつプローブを用いる場合には、対象とする遺伝子試料がもつ塩基配列間とのハイブリダイゼーション試験のことを意味する。

相同性の計算は、対象とする遺伝子の塩基配列領域、望ましくはその全領域に

において、個々に塩基配列が決定され相互に比較可能な領域の塩基配列の数を分母とし、その中で塩基配列が完全一致するものの数を分子として%計算する方法により、たとえば Genentyx-MAC 8.0 解析ソフト (Genetic Information Processing Software 社製) を用いて行うことができる。

配列番号 1～4 の塩基配列の相同性により *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定するには、16S rDNA の塩基配列に基づく種の一般的な判断基準に従うとよい。すなわち、16S rDNA のほぼ全領域を対象とし、その相同性が 97% 以下である場合には、便宜的に異種と判断することができる (E. Stackebrandt and B.M. Goebel, Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 846-849, 1994)。

たとえば、ある微生物の 16S rDNA の塩基配列について、配列番号 1～4 の塩基配列との相同性を Genentyx-MAC 8.0 (前出) のような解析ソフトを用いて計算した場合、その数値が 97% 以上の場合は同種と判断され、それが 97% 未満の場合には異種と判断される。

しかし、一部の分類群では、97% 以上の相同性があっても、異種と定義されている場合もある。たとえば、*Vibrio cholerae* と *Vibrio mimicus* の間では相同性が 98.9～99.4% もあることが知られている (清水と塚本：海洋細菌の分類と同定。海洋微生物とバイオテクノロジー、清水潮編。技報堂出版、pp.1-24, 1991)。また、*Vibrio* 科の海洋細菌を対象とした研究では、種の範囲は相同性が 99.3% 以上の集団であり、97% 以上の相同性をもった集団は属の範囲だと推測されている (清水と塚本：前出)。したがって、この 97% 以上の相同性という基準を根拠とした同定は、あくまで便宜的なものと考え、予め対象とする分類群についての種と相同性の関係を調べてから適用することが必要である。

具体的には、*Cycloclasticus* 属細菌の場合、*C. pugetii* の 1 種しか正式に種の認定がされていないため、97% の相同性が見られた場合には、便宜的に当該種と同定される。しかし、前述した *Vibrio* 属細菌の例を見ても明らかなように、今後の研究を必要とする当該属のような場合、97% 程度ではまだ異種の可能性が十分残されている。

RNA または DNA プローブを用いた DNA/DNA または DNA/RNA ハイブリダイゼーションにより、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を

同定するには、以下のようにするとよい。

同定に用いるハイブリダイゼーション手法としては、ドットプロットハイブリダイゼーション手法 (H. E. N. Bergmans and W. Gaastra, *New Nucleic Acid Techniques* (J. M. Walker ed.); *Methods in Molecular Biology*, vol. 4, Clifton, Humana press, pp. 385-390, 1983) やコロニーハイブリダイゼーション手法 (M. Grustein and D.S. Hogness, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 3961-3965, 1975)、サザンプロットハイブリダイゼーション手法 (E. M. Southern, *J. Mol. Biol.*, 98: 503-507, 1975)、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (またはホールセルハイブリダイゼーションとも言う) 手法 (R. I. Amann et al., *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169, 1995) などを用いることができる。これらのハイブリダイゼーション解析に用いる微生物からの DNA/RNA 試料の調製は、それぞれの文献に記載された公知の方法で行うことができる。

ここで、どのハイブリダイゼーション手法を用いるかによらず重要なことは、用いるプローブとそれが標的とする遺伝子塩基配列を有する標準菌株試料との間で、たとえば D. A. Stahl and R. Amann (*Development and application of nucleic acid probes. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.). John Wiley and Sons, West Sussex, pp.205-248, 1991*) などに記載された方法に基づき、ハイブリダイゼーションの温度条件や用いる緩衝液中のフォルムアミド濃度条件を推定し、事前に厳密なハイブリダイゼーション条件、理想的には 100% に満たない相補性の場合にはハイブリダイゼーション過程とその後の洗浄過程で遊離してしまう条件を実験的に決定しておくことである。

このようにして決定したハイブリダイゼーション条件に基づき、上記のような標的とする標準菌株やそれとは分類学上大きく離れた別の標準菌株からの遺伝子試料を対象試料として用い、未知試料に対してハイブリダイゼーションを行う。その結果、プローブに直接標識された放射性元素や蛍光物質または抗原 (この場合、その抗体に結合させておいた酵素作用を利用する) に起因して生ずる放射能や蛍光、化学発光等 (抗原-抗体-酵素検出系の場合には、用いる酵素基質を変えることで検出系を選択できる) の強度を測定し、対象試料のそれと対比する。

得られた未知試料でのハイブリダイゼーションの強度が、標的とする標準菌株のそれと同等であり、分類学上大きく離れたものとの間に大きな差が認められた場合（理想的には測定限界以下の強度しか検出できない場合）、この未知試料は標的微生物と同一種と同定またはその近縁種と特定することができる。

また、例えば、上記プローブの塩基配列（DNA断片）をプライマーとして用いて、PCRを行うことによって菌種の同定を行うこともできる。すなわち、同定の対象となる菌体を溶菌して、上記プローブの塩基配列をもつ DNA断片をプライマーとして添加した後、PCR増幅する。そのPCR産物を電気泳動等により解析し、16S rDNAの増幅が確認されれば、対象とした菌には、用いたDNA断片に相補的な遺伝子部位が存在していることになる。すなわち、配列番号1の塩基配列を有する16S rDNAを持つ微生物と同種の菌であることが特定できる。

本発明の方法により、検出、スクリーニングあるいは同定された *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌は、微生物製剤（例えば、石油分解用微生物製剤）として利用することができる。

また、本発明の16S rDNAやプローブの塩基配列情報を利用して、石油分解細菌の自然界や石油処理条件下における挙動を解明し、油濁海域への栄養塩などの添加あるいはこの石油分解微生物の散布により石油分解効率を賦活化するといった環境修復技術（バイオレメディエーション技術）の開発を図ることができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願平 11-237818 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例1〕

（1）重油流出事故現場海域における石油分解微生物等の調査

1997 年 1 月 2 日に起こった日本海重油流出事故により大量の重油が漂着した福井県三国町沿岸域の表層海水を汚染直後の 1 月 15 日に採取し、プランクトンネット（目合い：約 $30\mu\text{m}$ ）でろ過した後、マイクロプレート MPN（M-MPN）計数法により、現場表層海水中的の石油分解微生物を計数した。M-MPN 計数は、1/10NP 培地（ NH_4NO_3 , 100mg; Ferric citrate, 2mg; K_2HPO_4 , 2mg; Aged seawater, 800ml; Distilled water, 200ml; pH7.8）を 1.8ml ずつ分注した 24 穴マイクロプレートのウェル中で供試海水を 10 倍段階希釈後、唯一の炭素源として、n-テトラデカン、灯油および C 重油を各 $10\mu\text{l}$ 添加し、 20°C で培養した。この MPN 計数は 3 本法で行った。増殖の判定は各ウェルの培地の濁度や浮遊する石油の変化などを菌無接種の対照ウェルと比較して行った。並行して、基本的には Porter と Feig の方法（K.G. Porter and Y.S. Feig, Limnol. Oceanogr., 25:943-948, 1980）に準じて全菌数の計数、ならびに 1/2TZ 培地（Polypeptone, 2.5g; Bacto-Yeast extract, 0.5g; HEPES, 4.77g; Kester's artificial seawater, 900ml; Distilled water, 100ml; pH7.5）を用いた M-MPN 計数による従属栄養細菌の計数を行った。また、事故直後の 1997 年 1 月 15 日から約 1 年間にわたり、季節ごとに表層海水を採取し、上記方法により海水中的の全菌数を直接顕微鏡計数法、従属栄養細菌数や石油分解細菌数を MPN 法により調べた。

その結果、油流出現場海域の全菌数は 1 年を通し 10^5cells/ml オーダーレベルで特に大きな変動はみられなかったが、石油分解細菌数は大きく変動した。すなわち、流出油漂着直後の現場海水中的の n-テトラデカン、灯油、C 重油分解細菌数は、約 $10^3\sim 10^4\text{ MPN/ml}$ （全菌数に対する分解細菌数の比率（優占度）：1～10%）と高い値を示したが、同海域で約 2 ヶ月後では $10\sim 10^3\text{ MPN/ml}$ （優占度：0.01～1%）と著しく減少した。一方、従属栄養細菌数は、汚染直後は 10^4 MPN/ml 以上、約 2 ヶ月後においてもほぼ同程度の $10^4\sim 10^5\text{ MPN/ml}$ の値を示した。これらのことから、石油流出事故直後の現場微生物群集は、水温が $12\sim 13^\circ\text{C}$ と低い冬季であるにもかかわらず、石油成分に対する分解機能を通常より著しく高めていると判断された。

（2）現場海域に優占する石油分解微生物の選別

上記事故直後の 1997 年 1 月 15 日に採取した現場表層海水試料を用い、1/10NP

培地に C 重油を添加し M-MPN 計数に用いたウエルの中で、増殖が陽性と判定される最も高い希釈段階のウエル（増殖陽性フロント試料）の中から石油分解微生物試料を採取した。この微生物試料は、現場微生物群集を 10 倍段階希釈法により限界まで絞り込んだものの培養液であることから、この中の微生物は現場油濁海域で最も優占していたものと考えることができる。

（３）選別した石油分解微生物からの DNA の抽出

増殖陽性フロント試料を遠心分離により集菌し、567 μ l の TE バッファー（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）に懸濁した。この懸濁液に 30 μ l の 0.01% sodium dodecyl sulfate（SDS）と 3 μ l の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加え、37℃で 1 時間インキュベートした。次いで、5M NaCl を 100 μ l 加えよく攪拌し、65℃で 10 分間インキュベートした後、クロロホルム：イソアミルアルコール混合液（24:1）を 700 μ l 加え、穏やかに攪拌した。遠心後、上層（水層）を分取し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（20:24:1）を当量加え穏やかに攪拌した。遠心後、その上層（水層）を分取し、0.6 容のイソプロパノールを加え、DNA を遠沈した。その DNA は 70%エタノール（-20℃）で洗浄した後、乾燥させ 100 μ l の TE バッファーに溶解した。

（４）クローニング

（３）により回収・精製した DNA をテンプレートとして 16S rRNA 遺伝子の保存領域に対応するプライマー 27f および 1525r を用いて、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。

27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'（配列番号 8）

1525r:5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'（配列番号 9）

この PCR 産物（16S rDNA）は、電気泳動によりその存在を確認した後、Original TA Cloning(r) kit（Invitrogen Co.）を用いて、クローニングを行った。

（５）RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）解析

まず、無作為に 40 クローンを選び出し、それらクローンに 16S rRNA 遺伝子の全長がインサートされているかを確認した。その結果、17 クローンが 16S rRNA 遺伝子の全長がインサートされていることがわかった。次に、それら 17 クローンを、現場海域で優占していたと考えられる石油分解菌群集の大まかな傾向をつ

かむため、5種類の制限酵素 (*EcoRI*、*HindIII*、*SaII*、*XbaI* および *RsaI*) を用いて、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 解析によりグルーピングした。その結果、各制限酵素において、1～3種類の切断パターンが得られた。最終的には、5種類の制限酵素によるそれぞれの断片パターンから4グループに分かれた。

(6) フルシークエンシング

(5) の RFLP 解析によりグループに分けられた4グループから各1クローン、合計4クローン (CHO11-1-1、CHO11-1-2、CHO11-1-4、CHO11-1-34) を選抜し、16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定した。

シークエンスは、RNA シークエンスキット (Thermo Sequenase™ fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP、アマシャム社製) を用いて、オートシーケンサー (ALFred DNA Sequencer、ファルマシア社製) によりシークエンスを行い、16S rDNA の塩基配列を決定した。

(7) 分子系統解析

決定した4クロンの16S rDNA の塩基配列情報より、予備検索として Ribosomal Database Project (RDP) II (イリノイ大学) の検索エンジンを用いて、それらと類似の配列情報をもつ微生物の存在を調べた。次いで、この類似の配列ならびに各分類群の代表菌株の配列をデータベース (GenBank や EMBL、DDBJ 等) から入手 (ダウンロード) し、Clustal W (前出) や Se-Al (前出) プログラム等を用いて、この4クロンの16S rDNA の塩基配列とともに多重アラインメント処理を行った。このアラインメントデータ (約 1500 bp) を対象に、PHYLP (前出) プログラムを用い、NJ 法 (前出) による分子系統解析および 100 回反復によるブートストラップ解析を実施した。

その結果、1997年1月に起こった日本海重油流出事故直後の表層海水に優占していた石油分解微生物は、Proteobacteria の γ サブグループに属する細菌で、*Cycloclasticus pugetii* (*C. pugetii*) と非常に近縁のものであることが判明した。また、16S rDNA 塩基配列のほぼ全長を対象とした相同性解析の結果、この4クロンの内の3クローン (CHO11-1-2、CHO11-1-4、CHO11-1-34) は、*C. pugetii* のそれ (GenBank No.: U12624) と 99% 前後 (記載順に 99.2%、98.8、99.1%)

の相同性を、しかし、他の1クローン(CHO11-1-1)は、それより低い相同性(97.2%)しか見られないことがわかった。したがって、これら4クローンは、*C. pugetii*と同種またはその近縁種に由来する配列と推定された。*C. pugetii*と同種またはその近縁種と判断された4クローン(CHO11-1-1、CHO11-1-2、CHO11-1-4、CHO11-1-34)の16S rDNA塩基配列を、それぞれ配列番号1~4に示す。

上述した4クローンと非常に近縁と判断された *Cycloclasticus pugetii* は、最近、米国太平洋岸のポリ塩化ビフェニールで汚染されている海底堆積物から分離された芳香族炭化水素分解能を有する微生物として報告されている(S.E. Dyksterhouse et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 116-123, 1995)。そこで、本属種の標準菌株(ATCC 51542)を入手して調べた結果、この微生物はビフェニール等の特殊な有機物を添加した培地でのみ増殖するという特徴をもっており、それらを添加した平板培養では微小コロニーしか生成せず、通常の従属栄養微生物用培地では平板培養分離が困難であることが判明した。

一方、本発明の16S rDNA塩基配列情報は、石油流出事故直後の油濁海水中微生物試料から初めて発見されたものであり、海底堆積物からでも、ポリ塩化ビフェニール汚染海域からでもない点で大きな特徴を有する。これは、上述したように、*C. pugetii* またはその近縁種の分離が大変困難であることに起因するものと推測されるが、今後、本発明に記載されたような方法等により、世界中の海域で広く検出される可能性がある。

得られた16S rDNA塩基配列(配列番号1~4)は、石油汚染現場よりC重油を唯一の炭素源として用いた段階希釈培養液試料より得られたものであることから、それらはC重油中の炭化水素成分を分解し増殖した微生物に由来する遺伝子塩基配列情報と考えることができる。また、上述したように、これらの配列情報を有していた微生物は、芳香族炭化水素の分解能を有する *Cycloclasticus pugetii* に分子系統学上近縁であり、相互に高い相同性を有していることも示された。したがって、この配列番号1~4の塩基配列を有する微生物で、*C. pugetii* またはそれに近縁の微生物は、難分解性の多環芳香族炭化水素等の分解機能を有する細菌と考えることができる。このことは、配列番号1~4の遺伝子情報が、石油流

出現場の微生物相を調べる上で、また、その微生物相や該遺伝子情報を有する微生物の分布密度から石油の汚染状況やその分解状況を解析する上で、きわめて有効であることを意味している。

すなわち、流出原油や流出重油中の難分解性多環芳香族炭化水素は、易分解性脂肪族炭化水素等に比べ長期間汚染海域に残留するため、これら難分解性多環芳香族炭化水素を分解して増殖していた可能性が高い微生物由来の配列番号 1～4 の塩基配列情報は、実際の石油汚染沿岸環境やその汚染現場での石油汚染浄化修復プロセスをモニタリングする上で、きわめて有効な指標として利用できるものである。また、配列番号 1～4 の塩基配列情報は、*Cycloclasticus pugetii* またはそれに近縁の微生物に由来すると推測されるが、既知のものとは 100% の相同性を示さず新規な配列情報を含んでいる。したがって、この分類群において種またはグループ特異的なプローブを作製する上でも、きわめて有益なものと判断される。

さらに、以上のような一連の解析手法、すなわちマイクロプレート MPN/ダイレクト PCR/シーケンシング手法は、現場海域に優占する石油分解微生物を解析するのに非常に有効であることが明らかになった。

〔実施例 2〕

(1) *Cycloclasticus pugetii* に種特異的な配列の選択 (プローブデザイン)

実施例 1 で行った分子系統解析の結果を用い、16S rRNA の高次構造を考慮して、*C. pugetii* に特異的な配列を選択した (プローブデザインを行った)。デザインした 2 種類のプローブ (Cyclopug829-846 と Cyclopug847-866) を以下に示す。

◆プローブ Cyclopug829-846

5'-GGAAACCCGCCCAACAGT-3' (829-846*, 18mer) (配列番号 5)

(3'-CCTTTGGGCGGGTTGTCA-5')

◆プローブ Cyclopug847-866

5'-TGCACCACTAAGCGGAAACC-3' (847-866*, 20mer) (配列番号 6)

(3'-ACGTGGTGATTTCGCCTTTGG-5')

ここで、*は、*Escherichia coli* の 16S rDNA 塩基配列における 5'末端からの位置（ナンバーリングシステム）を示す。

（２）データベースによるプローブチェック

（１）でデザインしたプローブの特異性を確認するため、データベース（Ribosomal Database Project II, RDP）を用いて、プローブマッチ検索を行った。検索エンジンは、RDP に付属されているものを使用し、ミスマッチ配列を 2 塩基の条件で行った。その結果、デザインした 2 つのプローブとも RDP 上の *Cycloclasticus* 属 6 株のみとマッチし、ミスマッチ配列が 1 塩基もなく完全に一致した。また、2 つのプローブとも自己結合しないことが確認された。これらの *Cycloclasticus* 属 6 株は、2 株が *C. pugetii* で、残りの 4 株は *Cycloclasticus* sp. で未同定株か未承認種の株である。参考までに、RDP 上でマッチした *Cycloclasticus* 属 6 株の由来を表 1 に示す。

表 1 RDP に登録されている *Cycloclasticus* 属細菌の由来

Source	DataBase accession no.	Reference
<i>Cycloclasticus pugetii</i> str. PS-1(T)ATCC51542	U12624	1
<i>Cycloclasticus pugetii</i> str. PS-1(T)ATCC51542	L34955	1
<i>Cycloclasticus</i> sp. N3-PA321	U57920	2
<i>Cycloclasticus</i> sp. G	AF093002	3
<i>Cycloclasticus</i> sp. E	AF093003	3
<i>Cycloclasticus</i> sp. W	AF093004	3
<i>Cycloclasticus</i> sp. (<i>oligotrophus</i>)	AF148215	4

1. DYKSTERHOUSE et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 43:116-123, 1995
2. GEISELBECHT et al., Appl. Environ. Microbiol., 62:3344-3349, 1996
3. GEISELBECHT et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:4703-4710, 1998
4. BUTTON et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:4467-4476, 1998

ここで、*Cycloclasticus* 属の 16S rDNA 塩基配列情報としては、7 件 6 株のも

のが RDP データベース上に登録されている。この中で、IJSB (International Journal of Systematic Bacteriology) や IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) 等に発表され正式に種と認められているものは、*C. pugetii* のみであり、現状では一属一種の分類群である。表 1 中、*C. oligotrophus* は未承認種で、*C. pugetii* との違いは明確でない (当該配列間の相同性は 99.3%)。

以上のことから、今回、油濁環境由来の微生物 16S rDNA 塩基配列からデザインした 2 つのプロープは、*Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種と非常に高い特異性をもっていることが明らかになった。

〔実施例 3〕

デザインしたプロープと *Cycloclasticus pugetii* の標準菌株 ATCC51542 が特異的にハイブリダイズすることを Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により確認した。

(1) プロープの合成と標識

実施例 2 において、データベースにより特異性が確認されたプロープの Cyclopug829-846 及び Cyclopug847-866 を DNA 合成機により合成し、常法により精製した。それらのプロープ Cyclopug829-846 及び Cyclopug847-866 の 5'末端を Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) でラベルした。

(2) 供試菌株の培養と固定

C. pugetii の標準菌株 ATCC51542 を America Type Culture Collection (ATCC) から入手し、ポリ塩化ビフェニルを添加した 1/2TZ 培地 (前述) を用いて、20℃で培養した。また、対照菌株として、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)、*Bacillus marinus* (*B. marinus*)、*Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) および *Psychrobacter immobilis* (*Psy. immobilis*) の 4 種菌の標準菌株を、菌株保存機関が推奨する培地と温度で培養した。それぞれの培養細胞は、3%(w/v)パラホルムアルデヒド/3 x PBS (NaCl, 24.0g; KCl, 0.6g; Na₂HPO₄, 4.32g; KH₂PO₄, 0.72g) 溶液 (pH 7.2-7.4) で固定し、遠心分離により集菌した後、3xPBS バッファーで洗浄した。さらに、対照プロープとしては、分子系統樹

における Bacteria ドメインに特異的なプローブ EUB338 (R.I. Amann et al., J. Bacteriol, 172: 762-770, 1990) を供した。

(3) ハイブリダイゼーション

(2) で前処理を行った *C. pugetii* と 4 種類の対照菌株の細胞をそれぞれゼラチンコーティング (0.1% gelatine, 0.01% $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$) してあるスライドガラスに滴下し、室温で乾燥させ、スライドガラス上に固定した。その後、50 と 80、100%エタノールを用いて脱水した。

スライドガラスの試料上にハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl, sodium sulphate buffer [pH 7.2], 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 5mM EDTA 1mg/ml Denhalt solution × 10 Poly (A)) 15 μl を滴下した後、プローブを 5ng/ μl となるように添加して、ハイブリチャンバー内 (湿潤状態) で 45℃、4.5 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ終了後、スライドガラス上を 5ml の洗浄バッファー (50mM sodium phosphate buffer [pH 7.0], 0.1%SDS, 0.9M NaCl) で洗い流し、50ml の洗浄バッファー中に 42℃、30 分間浸した。その後、蒸留水で洗浄し風乾した。次いで、試料上に 1~5 $\mu\text{g/ml}$ の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を添加して室温で 5 分染色した。蒸留水で洗浄した後、風乾し退色防止剤を滴下し、スライドガラスを被せ封入した。観察は、蛍光顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて UV 励起、B 励起および G 励起で行った。

その結果を表 2 に示す。今回デザインしたプローブ Cyclopug829-846 および Cyclopug847-866 の場合、UV 励起では各細胞中 DNA に DAPI が普遍的に結合した結果として、DAPI 由来の青色蛍光が *C. pugetii* および対照菌株として供した 4 種類 (*P. aeruginosa*, *B. marinus*, *V. parahaemolyticus* および *Phy. immobilis*) とともに観察することができた。しかし、同視野を G 励起で観察すると、*C. pugetii* のみがプローブ Cyclopug829-846 および Cyclopug847-866 と相補的な配列を持つため、プローブの 5'末端をラベルした TRITC 由来の赤色蛍光を発した。

表 2

Cycloclasticus pugetii またはその近縁種に特異的な DNA プローブの有効性

供試標準菌株	供試プローブ		
	Cyclopug829-846	Cyclopug847-866	EUB338
<i>Cycloclasticus pugetii</i>	○*	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	×**	×	○
<i>Bacillus marinus</i>	×	×	○
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	×	×	○
<i>Psychrobacter immobilis</i>	×	×	○

*, ハイブリダイズし、顕微鏡観察において、蛍光を発したことを示す。

**, ハイブリダイズせず、顕微鏡観察ができなかったことを示す。

一方、Bacteria ドメインに特異的なプローブ EUB338 の場合は、B 励起での観察においても *C. pugetii* および 4 種類の対照菌株とも、それぞれ EUB338 の 5' 末端をラベルした FITC 由来の緑色蛍光を発した。

以上のことから、今回、油濁環境由来の微生物 16S rDNA 塩基配列からデザインした 2 つのプローブは、*Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種を特異的に検出する上で、その高次構造に起因する結合上の妨害も見られず、実際に大変有効であることが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明により、自然環境（例えば、石油汚染時の現場環境など）で優占する微生物を解明する手法が提供された。

また、本発明の手法により解析された 16S rDNA の塩基配列情報は、油濁環境で優占する能力を有する天然の石油分解微生物に由来すると考えられる。従って、この遺伝子およびこの遺伝子情報に基づいて本微生物の特異的な検出を可能にす

るように設計された DNA プローブの塩基配列情報は、この石油分解微生物の自然界や石油処理条件下における挙動を解明し、油濁海域への栄養塩などの添加あるいはこの石油分解微生物の散布により現場石油分解効率を賦活化するといった環境修復技術（バイオレメディエーション技術）の開発を図る上で、きわめて大きな利便性がある。

本発明により、自然環境（例えば、石油や有害化学物質によって汚染された現場環境など）に優占する微生物やバイオレメディエーション過程における分解微生物の挙動を解明する手法が提供された。

さらに、本発明は、微生物を平板培養分離するという手法によらず、特定機能を有する微生物または微生物群を液体培養で選別し、その機能や系統分類学的位置を遺伝子レベルで解析する方法を提供するものである。従って、上記分解機能を有する微生物のみならず、これまで分離が困難であった酵素等有用物質を生産する微生物の検出、定量およびスクリーニングにも有益である。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 ～ 4 は、16S rDNA の塩基配列を示す。

配列番号 5 ～ 7 は、プローブの塩基配列を示す。

配列番号 8 および 9 は、プライマーの塩基配列を示す。

請 求 の 範 囲

1. 自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法であって、以下の工程：

1) 自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行った後、増殖した特定機能微生物の計数を行う一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行い、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物数の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、

2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出し、該 DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、

3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および

4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む前記方法。

2. 特定機能微生物および全従属栄養微生物の計数を MPN 法により行い、全菌数の計数を直接顕微鏡計数法により行い、特定機能微生物の増殖を顕微鏡観察により判定する請求項 1 記載の方法。

3. 特定機能微生物が特定の化学物質を分解する微生物である請求項 1 または 2 記載の方法。

4. 特定の化学物質が有害化学物質である請求項 3 記載の方法。

5. 特定の化学物質が石油および石油成分である請求項 3 記載の方法。

6. 請求項 1 または 2 記載の方法を用いて、自然環境に優占している微生物の遷移を解析することにより、自然環境の微生物群集機能を評価する方法。

7. 請求項 1 または 2 記載の方法を用いて、汚染環境を解析・評価する方法。
8. 請求項 3 または 4 記載の方法を用いて、有害化学物質汚染環境を解析・評価する方法。
9. 請求項 5 記載の方法を用いて、油濁環境を解析・評価する方法。
10. 特定機能微生物が有用酵素生産微生物である請求項 1 または 2 記載の方法。
11. 配列番号 1～4 のいずれかの塩基配列を有する 16S rDNA。
12. 配列番号 1～4 のいずれかの塩基配列の一部を有し、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌と特異的にハイブリダイズしうる、塩基長 10～50 bp の RNA または DNA プローブ。
13. 配列番号 1～4 のいずれかの塩基配列の一部が配列番号 5、6 および 7 の塩基配列からなる群より選択される請求項 12 記載の RNA または DNA プローブ。
14. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を検出または定量するための請求項 12 または 13 に記載の RNA または DNA プローブ。
15. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 14 記載の RNA または DNA プローブ。
16. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌をスクリーニングするための請求項 12 または 13 に記載の RNA または DNA プローブ。
17. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 16 記載の RNA または DNA プローブ。
18. 請求項 12 または 13 記載の RNA または DNA プローブを用いて、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を検出または定量する方法。
19. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 18 記載の方法。
20. 請求項 12 または 13 記載の RNA または DNA プローブを用いて、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌をスクリーニングする方法。
21. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 20 記載の方法。

22. 配列番号1の塩基配列との相同性、または請求項12または13記載のRNAまたはDNAプローブを用いたDNA/DNAまたはDNA/RNAハイブリダイゼーションにより *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定する方法。

23. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項22記載の方法。

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

Nishimatu Construction CO.,LTD

NYK LOGISTICS TECHNOLOGY INSTITUTE

<120> A method for detecting or quantifying bacteria having a specific function and the genes thereof from natural environment, novel 16 S rDNA gene information, and probes

<130> probe

<140>

<141>

<150> JP P1999-237818

<151> 1999-08-25

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1532

<212> DNA

<213> *Cycloclasticus pugetii*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1532)

<400> 1

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggccggcatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggaacacagaa tgcagcttgc tagcaggcgg tcgagtggcg gacgggtgag ttatgcatag 120
gaatccgccc gatagtgggg gacaacctcc tgaaaacgct gctaataccg cataatccc 180
cgggggcaaa gacggggacc ttcgggcctt gctctaattg atgagcctac aggggattag 240
gtagttggtg aggtaacggc tcaccaaggc aacgatccct agctggttg agaggatgat 300
cagccacact gggactgaga cagggcccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat 360
tgcacaatgg aggaaactct gatgcagcaa tgccgcgtgt gtgaagaagg ccttaggggt 420
gtaaagcact ttcagtaggg aggaaaagt taagggtaat aacccttagg ccctgacgtt 480
acctacagaa gaagcaccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtataac ggagggtgca 540
agcgtaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgcagcc ggtaaaca gtcagatgtg 600
aaagccccgg gctcaacctg ggaactgcat ttgaaactgg ctagctagag tgtggtagag 660
gagagtggaa tttcaggtgt agcggtgaaa tgcgtagata tctgaaggaa caccagtggc 720
gaaggcggct ctctggacca aactgacgc tgaggtcga aagcgtgggt agcaaaccgg 780
attagatacc ccgtagtcc acgccgtaaa cgatgtcaac taactgttg gcgggttcc 840
gcttagtggt gcastaacgc aataagttga ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa 900
actcaaatga attgacgggg gccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcatgca 960
acggaagaa ccttacctac cctgacata cagagaactt tctagagata gattggtgcc 1020
ttcgggaact ctgatacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctcgtgtcgt gagatgttg 1080
gttaagtccc gtaacgagcg caacccttat ccttagttgc taccatttag ttgggcactc 1140
taaggagact gccgtgata aaccggagga aggtggggac gacgtcaagt catcatggcc 1200
cttatgggta gggctacaca cgtgctacaa tggccgtac agagggccgc aaactcgcga 1260
gagtaagcta atcccttaa gccggtccta gtccgattg cagtctgca ctcgactgca 1320
tgaagctgga atcgctagta atcgcgatc agaatgccg ggtgaattcg ttccgggcc 1380
ttgtacacac cgccgtcac accatgggag tgggttgcaa aagaagtggg taggctaacc 1440

ttcgggaggc cgctcaccac tttgtgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc 1500
cctaggggaa cctggggctg gatcacctcc tt 1532

<210> 2

<211> 1538

<212> DNA

<213> *Cycloclasticus pugetii*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1538)

<400> 2

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcgcatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggaaacgatg ctagcttgct agcaggcgtc gtagggcgga cgggtgagta atgcatagga 120
atctacctaa tagtgtggga caacctggtg aaaaccaggc taataccgca taatccctac 180
ggggcaaacg aggggacctt cgggccttgc gctaatagat gaggctatgt cggattagct 240
agttggtgag gtaatggctc accaaggcaa cgatccgtag ctggtttgag aggatgatca 300
gccacactgg gactgagaca cgcccagac tctacggga ggcagcagtg gggaatattg 360
cacaatggag gaaactctga tgcagcaatg ccgcgtgtgt gaagaaggcc ttagggttgt 420
aaagcacttt cagtagggag gaaaagttaa aggttaataa ccttagggcc tgacgttacc 480
tacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc acagccggcg gtaatacgga gggtgcaagc 540
gttaatcgga attactgggc gtaaagcgcg ctagggcggg taaacaagtc agatgtgaaa 600
gccccgggct caacctggga actgcatttg aaactgttta gctagagtgt ggtagaggag 660
agtggaattt caggtgtagc ggtgaaatgc gtagatatct gaaggaacac cagtggcgaa 720
ggcggctctc tggaccaaca ctgacgtga ggtgcgaaag cgtgggtagc aaacgggatt 780
agataccccg gtagtcacg ccgtaaacga tgtcaactga ctgttggcg ggtttccgct 840
tagtggtgca staaacgaat aagttgaccg cctggggagt acggccgcaa ggctaaaact 900
caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960

cgaagaacct tacctaccct tgacatacag agaactttct agagatagat tggcgccttc 1020
 gggaactctg atacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
 aagtcccgta acgagcgcaa cccttatcct tagttgctac catttagttg ggcactctaa 1140
 ggagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcac catggccctt 1200
 atgggtaggg ctacacacgt gctacaatgg ccggtacaga gggccgcaaa ctgcgagag 1260
 taagetaatc ccttaaagcc ggtcctagtc cggattgcag tctgcaactc gactgcatga 1320
 agctggaatc gctagtaatc gcggatcaga atgccgcggt gaattcggtc ccgggccttg 1380
 tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaaaag aagtgggtag gctaacttcg 1440
 ggaggccgct caccactttg tgattcatga ctgggggtgaa gtcgtaacaa ggtagcccta 1500
 gggaacctg gggctggatc acctcctt 1538

<210> 3

<211> 1532

<212> DNA

<213> *Cycloclasticus pugetii*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1532)

<400> 3

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggccgcatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggaaacgatg ctagcttget agcaggcgtc gattggcgga cgggtgagta atgcatagga 120
 atctacctaa cagtggggga caacctggtg aaaaccagsc taataccgca taatccctaa 180
 cgggcaaagc aggggacctt cgggccttgc gctaatagat gagcctatgt cggattagct 240
 agttggtgag gtaatggccc accaaggcaa cgatccgtag ctggtttgag aggatgatca 300
 gccacactgg gactgagaca cggcccgac tctacggga ggcagcagtg gggaatattg 360
 cacaatggag gaaactctga tgcagcaatg ccgcgtgtgt gaagaaggcc ttagggttgt 420
 aaagcacttt cagtagggag gaaaagtta aggttaataa ccttaggccc tgacgttacc 480

tacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggggtgcaag 540
cgtaatacgg aattactggg cgtaaagcgc gcgtaggcgg ttaacaagt cagatgtgaa 600
agccccgggc tcaacctggg aactgcattt gaaactgttt agctagagtg tggtagagga 660
gagtgggaatt tcaggtgtag cggtgaaatg cgtagatata tgaaggaaca ccagtggcga 720
aggcggtct ctggaccaac actgacgctg aggtgcgaaa gcgtgggtag caaacgggat 780
tagatacccc ggtagtcac gccgtaaacg atgtcaacta actgttgggc gggtttccgc 840
ttagtggtgc astaacgcaa taagtgacc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac 900
tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac 960
gcgaagaacc ttacctacc ttgacataca gagaactttc tagagataga ttggtgcctt 1020
cggaactct gatacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1080
taagtcccgt aacgagcgc nycctatcct tagttgctac catttagttg ggcactctaa 1140
ggagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcac catggccctt 1200
atgggtaggg ctacacacgt gctacaatgg ccggtacaga gggccgcaaa ctgcgagag 1260
taagctaata ccttaaagcc ggtcctagtc cggattgcag tctgcaactc gactgcatga 1320
agctggaatc gctagtaatc gcggtacaga atgccgcgt gaattcgctt ccgggccttg 1380
tacacaccgs ccgtcacacc atgggagtg gttgcaaaag aagtgggtag gctaacttc 1440
gggaggccgc tcaccattt gtgattcatg actggggtga agtcgtaaca aggtagcct 1500
aggggaacct ggggctggat cacctcctt 1539

<210> 4

<211> 1526

<212> DNA

<213> Cycloclasticus pugetii

<220>

<221>rRNA

<222>(1)..(1526)

<400>4

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcgcatgc taacacatgc aagtcgaacg 60
 gaaacgatgc tagcttgcta caggcgctga gtggcgacg ggtgagtaat gcataggaat 120
 ctacctaata gtgggggaca acctggtgaa aaccagctaa taccgcataa tcctacggg 180
 gcaaagcagg ggaccttcgg gccttgctgct aatagatgag cctatgtcgg attagctagt 240
 tggtagagta atggctcacc aaggcaacga tccgtagctg gtttagagagg atgatcagcc 300
 aactgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggg agcagtgggg aatattgcac 360
 aatggaggaa actctgatgc agcaatgccg cgtgtgtgaa gaaggcctta gggttgtaaa 420
 gcactttcag tagggaggaa aagttaagg ttaataacct taggcctga cgttacctac 480
 agaagaagca ccggtaact ccgtgccagc agccgcggtatacggaggg tgcaagcgtt 540
 aatcggaatt actgggcgta aaagcgcgcg taggcggtta aacaagtcag atgtgaaagc 600
 cccgggctca acttggaac tgcatttgaa actgtttagc tagagtgtgg tagaggagag 660
 tggaatttca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agatatctga aggaacacca gtggcgaagg 720
 cggtctctg gaccaacact gacgtgagg tgcgaaagcg tggtagcaa acgggattag 780
 ataccccggt agtcacgcc gtaaacgatg tcaactaact gttgggcggg tttccgctta 840
 gtggtgcant aagcaataa gttaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca 900
 aatgaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg 960
 aagaacctta cctaccctg acatacagag aactttctag agatagattg gtgcttcggg 1020
 aactctgata cagggtctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
 tccgtaacg agcgcaaccc ttatccttag ttgctacat ttagttgggc actctaagga 1140
 gactgccggt gataaaccgg aggaaggtgg ggacgacgtc aagtcatcat ggcccttatg 1200
 ggtagggcta cacacgtgct acaatggccg gtacagaggg ccgcaaactc gcgagagtaa 1260
 gctaatccct taaagccggg cctagtcggg attgcagtct gcaactcgac tgcataagc 1320
 tggaatcgct agtaatcgcg gatcagaatg ccgcggtgaa ttcgttccc ggccttgatc 1380
 acaccgcccg tcacaccatg ggagtgggtt gcaaaagaag tgggtaggct aacttcggga 1440
 ggccgctcac cactttgtga ttcagtactg ggggtgaagtc gtaacaaggt agccctaggg 1500
 gaacctgggg ctggatcacc tcctta 1526

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

ggaaacccgc ccaacagt

18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

tgcaccacta agcggaaacc

20

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

ggaaacccgc ccaacagtg caccactaag cggaacc

38

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

agagtttgat cctggctcag

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

aaaggaggtg atccagcc

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, 1/04, C12N15/11 // (C12N15/11, C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-1/70, C12N15/11-15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, JICST FILE (JOIS),
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	GEISELBRECHT, Allison D. et al., "Isolation of Marine Poly- cyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Cycloclasticus Strains from the Gulf of Mexico and Comparison of Their PAH Degradation Ability with That of Puget Sound Cycloclasticus Strains", Applied and Environmental Microbiology, December, 1998, Volume 64, Number 12, pages 4703-4710	11 1-10, 12-23
X A	DYKSTERHOUSE, Sheryl E. et al., "Cycloclasticus pugetii gen. nov., sp. nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments", International Journal of Systematic Bacteriology, January, 1995, Volume 45, Number 1, pages 116-123	11 1-10, 12-23
X A	GEISELBRECHT, Allison D. et al., "Enumeration and Phylogenetic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Marine Bacteria from Puget Sound Sediments", Applied and Environmental Microbiology, September, 1996, Volume 62, Number 9, pages 3344-3349	11 1-10, 12-23
A	JP, 10-155498, A (Mitsui Engineering & Shipbuilding Co.,	- 1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 November, 2000 (17.11.00)

Date of mailing of the international search report
28 November, 2000 (28.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05711

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Ltd.), 16 June, 1998 (16.06.98) (Family: none)	
A	WALKER, John D., "Chemical Fate of Toxic Substances: Biodegradation of Petroleum", Marine Technology Society Journal, 1984, Volume 18, Number 3, pages 73-86	1-10
A	HAINES, J. R., "Assessment of mixed culture for bioremediation product testing", In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4, 1997, pages 419-424	1-10
A	JP, 9-98771, A (Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd.), 15 April, 1997 (15.04.97) (Family: none)	1-10
A	HUU, Nguyen B. et al., "Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well", International Journal of Systematic Bacteriology, April, 1999, Volume 49, Part 2, pages 367-375	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05711

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The requirement of unity of invention in international application (PCT Rule 13.1) is not satisfied unless there is a technical relationship in a group of inventions as set forth in claims involving one or more of the same or corresponding special technical features. The term "special technical features" as used herein means technical features which clearly indicate the contribution to the prior art achieved by the inventions as set forth in claims as a whole (PCT Rule 13.2).

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05711

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Now, the unity of invention in the present international application will be examined.

The technical matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 10 resides in "methods of detecting and quantitating a microorganism having a specific function and its gene from natural environment". On the other hand, the technical matter common to the inventions as set forth in claims 11 to 23 resides in "petroleum-digesting bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus*". Accordingly, there is no "special technical feature" as specified in PCT Rule 13.2 between the group of the inventions of claims 1 to 10 and the group of the inventions of claims 11 to 23. Although the invention as set forth in claim 5 pertains to "microorganisms digesting petroleum", "microorganisms digesting petroleum" had been publicly known before the filing date of the present international application. Therefore, it can be concluded that there is no "special technical feature" between the invention of claim 5 and the group of the inventions of claims 11 to 23.

Such being the case, these claims involve two groups of inventions, i.e., ① the group of the inventions of claims 1 to 10 and ② the group of the inventions of claims 11 to 23.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, 1/04, C12N15/11 // (C12N15/11, C12R1:01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00-1/70, C12N15/11-15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, JICSTファイル (JOIS),
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	GEISELBRECHT, Allison D. et al., "Isolation of Marine Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading <i>Cycloclasticus</i> Strains from the Gulf of Mexico and Comparison of Their PAH Degradation Ability with That of Puget Sound <i>Cycloclasticus</i> Strains", Applied and Environmental Microbiology, December, 1998, Volume 64, Number 12, pages 4703-4710	11 1-10, 12-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 00

国際調査報告の発送日

28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生 印

4 N

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	DYKSTERHOUSE, Sheryl E. et al., " <i>Cycloclasticus pugetii</i> gen. nov., sp. nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments", International Journal of Systematic Bacteriology, January, 1995, Volume 45, Number 1, pages 116-123	11 1-10, 12-23
X A	GEISELBRECHT, Allison D. et al., "Enumeration and Phylogenetic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Marine Bacteria from Puget Sound Sediments", Applied and Environmental Microbiology, September, 1996, Volume 62, Number 9, pages 3344-3349	11 1-10, 12-23
A	JP, 10-155498, A (三井造船株式会社) 16.6月.1998 (16.06.98), (ファミリーなし)	1-10
A	WALKER, John D., "Chemical Fate of Toxic Substances: Biodegradation of Petroleum", Marine Technology Society Journal, 1984, Volume 18, Number 3, pages 73-86	1-10
A	HAINES, J. R., "Assessment of mixed culture for bioremediation product testing", In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4, 1997, pages 419-424	1-10
A	JP, 9-98771, A (石川島播磨重工業株式会社) 15.4月.1997 (15.04.97), (ファミリーなし)	1-10
A	HUU, Nguyen B. et al., " <i>Marinobacter aquaeolei</i> sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well", International Journal of Systematic Bacteriology, April, 1999, Volume 49, Part 2, pages 367-375	1-23

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件 (PCT規則13.1) は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである (PCT規則13.2)。

そこで、本件国際出願の発明の単一性について検討する。

請求の範囲1-10の発明に共通する事項は「工程1)~4)を含む自然環境から特定機能

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法」であるのに対し、請求の範囲11-23の発明に共通する事項は「*Cycloclasticus*属の石油分解細菌」であるから、請求の範囲1-10の発明と請求の範囲11-23の発明の間には、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」は存在しない。なお、請求の範囲5の発明は「石油を分解する微生物」に関連するものではあるが、「石油を分解する微生物」は本国際出願時に公知であったから、請求の範囲5の発明と請求の範囲11-23の発明の間にも、同「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

したがって、請求の範囲には、①請求の範囲1-10の発明、及び、②請求の範囲11-23の発明、の2発明が包含されている。

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理官庁記入欄	
国際出願番号:	
国際出願日	PCT 24.8.00
(受付印)	受領印
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字)	FP00-004PCT

第 I 欄 発明の名称

自然環境からの特定機能微生物およびその遺伝子の検出・定量方法、
新規16SrRNA遺伝子情報およびプローブ

第 II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

工業技術院長が代表する日本国
JAPAN AS REPRESENTED BY SECRETARY OF AGENCY
OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY
〒100-8921
日本国東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
3-1, Kasumigaseki 1-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8921 Japan

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

西松建設株式会社
NISHIMATSU CONSTRUCTION CO. LTD.
〒105-8401
日本国東京都港区虎ノ門1丁目20番10号
20-10, Toranomon 1-chome, Minato-ku,
Tokyo 105-8401 Japan

この欄に記載した者は
次に該当する:

☒ 出願人のみである。

☐ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

09812 弁理士 間山 世津子 MAYAMA Setsuko
〒242-0007
日本国神奈川県大和市中央林間3丁目4番4号
サクライビル 4階 間山・林合同技術特許事務所
Mayama, Hayashi & Mayama, 4th Fl. Sakurai Bldg.,
4-4, Chuorinkan 3-chome, Yamato-shi,
Kanagawa 242-0007 Japan

電話番号:

046-277-0540

ファクシミリ番号:

046-278-0320

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

株式会社エヌワイケイ輸送技術研究所
 NYK LOGISTICS TECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.
 〒235-0033
 日本国神奈川県横浜市磯子区杉田5丁目32番84号
 32-84, Sugita 5-chome, Isogo-ku, Yokohama-shi,
 Kanagawa 235-0033 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☒ 出願人のみである。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である； 氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

丸山 明彦 MARUYAMA Akihiko
 〒305-8566
 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3
 工業技術院 生命工学工業技術研究所内
 c/o National Institute of Bioscience and Human-Technology,
 Agency of Industrial Science and Technology
 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi,
 Ibaraki 305-8566 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である； 氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

東原 孝規 HIGASHIHARA Takanori
 〒305-8566
 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3
 工業技術院 生命工学工業技術研究所内
 c/o National Institute of Bioscience and Human-Technology,
 Agency of Industrial Science and Technology
 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi,
 Ibaraki 305-8566 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

指定国についての出願人である； 氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

石渡 寛之 ISHIWATA Hiroyuki
 〒105-8401
 日本国東京都港区虎ノ門1丁目20番10号
 西松建設株式会社内
 c/o Nishimatsu Construction Co. Ltd.
 20-10, Toranomon 1-chome, Minato-ku,
 Tokyo 105-8401 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する：

☐ 出願人のみである。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者のみである。
（ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと）

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国☒ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと：少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域域半島等

☐ A P A R I P O 特許：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シェラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, TZ タンザニア United Republic of Tanzania, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国

☐ E A ユーラシア半島等：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国

☒ E P ヨーロッパ半島等：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国

☐ O A O A P I 半島等：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国印半島等（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

☐ A E アラブ首長国連邦 United Arab Emirates
☐ A L アルバニア Albania
☐ A M アルメニア Armenia
☐ A T オーストリア Austria
☒ A U オーストラリア Australia
☐ A Z アゼルバイジャン Azerbaijan
☐ B A ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina
☐ B B バルバドス Barbados
☐ B G ブルガリア Bulgaria
☐ B R ブラジル Brazil
☐ B Y ベラルーシ Belarus
☒ C A カナダ Canada
☐ C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein
☐ C N 中国 China
☐ C R コスタリカ Costa Rica
☐ C U キューバ Cuba
☐ C Z チェッコ Czech Republic
☐ D E ドイツ Germany
☐ D K デンマーク Denmark
☐ D M ドミニカ Dominica
☐ E E エストニア Estonia
☐ E S スペイン Spain
☐ F I フィンランド Finland
☐ G B 英国 United Kingdom
☐ G D グレナダ Grenada
☐ G E グルジア Georgia
☐ G H ガーナ Ghana
☐ G M ガンビア Gambia
☐ H R クロアチア Croatia
☐ H U ハンガリー Hungary
☐ I D インドネシア Indonesia
☐ I L イスラエル Israel
☐ I N インド India
☐ I S アイスランド Iceland
☒ J P 日本 Japan
☐ K E ケニア Kenya
☐ K G キルギス Kyrgyzstan
☐ K P 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea
☐ K R 韓国 Republic of Korea
☐ K Z カザフスタン Kazakhstan
☐ L C セント・ルシア Saint Lucia
☐ L K スリ・ランカ Sri Lanka

☐ L R リベリア Liberia
☐ L S レソト Lesotho
☐ L T リトアニア Lithuania
☐ L U ルクセンブルグ Luxembourg
☐ L V ラトヴィア Latvia
☐ M A モロッコ Morocco
☐ M D モルドヴァ Republic of Moldova
☐ M G マダガスカル Madagascar
☐ M K マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia
☐ M N モンゴル Mongolia
☐ M W マラウイ Malawi
☐ M X メキシコ Mexico
☐ N O ノールウェー Norway
☐ N Z ニュー・ジーランド New Zealand
☐ P L ポーランド Poland
☐ P T ポルトガル Portugal
☐ R O ルーマニア Romania
☐ R U ロシア Russian Federation
☐ S D スーダン Sudan
☐ S E スウェーデン Sweden
☐ S G シンガポール Singapore
☐ S I スロヴェニア Slovenia
☐ S K スロヴァキア Slovakia
☐ S L シェラ・レオネ Sierra Leone
☐ T J タジキスタン Tajikistan
☐ T M トルクメニスタン Turkmenistan
☐ T R トルコ Turkey
☐ T T トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago
☐ T Z タンザニア United Republic of Tanzania
☐ U A ウクライナ Ukraine
☐ U G ウガンダ Uganda
☒ U S 米国 United States of America
☐ U Z ウズベキスタン Uzbekistan
☐ V N ヴィエトナム Viet Nam
☐ Y U ユーゴスラヴィア Yugoslavia
☐ Z A 南アフリカ共和国 South Africa
☐ Z W ジンバブエ Zimbabwe

下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定するためのものである

☐
☐
☐

指定の確認の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認（料金を含む）は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

様式 PCT/RO/101 (第2用紙) (2000年1月)

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄……の続き」（欄番号を表示する）と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続案」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しているとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名（名称）を表示し、それぞれの氏名（名称）の次にその者が出願人となる指定国（広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許）を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国（広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許）を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅵ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国又は世界貿易機関の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

第Ⅲ欄の続き

氏名及びあて名

藤田 恒美 FUJITA Tsunemi

〒235-0033

日本国神奈川県横浜市磯子区杉田5丁目32番84号

株式会社エヌワイケイ輸送技術研究所内

c/o NYK Logistics Technology Institute Co., Ltd.

32-84, Sugita 5-chome, Isogo-ku, Yokohama-shi,

Kanagawa 235-0033 Japan

国籍(国名): 日本国 JAPAN 住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は次に該当する: 出願人及び発明者である。

この欄に記載した者は次の指定国についての出願人である: 米国のみ

第Ⅳ欄の続き

11060 弁理士 間山 進也 MAYAMA Shinya

〒242-0007

日本国神奈川県大和市中心林間3丁目4番4号

サクライビル 4階 間山・林合同技術特許事務所

Mayama, Hayashi & Mayama, 4th Fl. Sakurai Bldg.,

4-4, Chuorinkan 3-chome, Yamato-shi,

Kanagawa 242-0007 Japan

電話番号 046-277-0540

ファクシミリ番号 046-278-0320

第Ⅳ欄の続き

11252 弁理士 林 茂則 HAYASHI Shigenori

〒242-0007

日本国神奈川県大和市中心林間3丁目4番4号

サクライビル 4階 間山・林合同技術特許事務所

Mayama, Hayashi & Mayama, 4th Fl. Sakurai Bldg.,

4-4, Chuorinkan 3-chome, Yamato-shi,

Kanagawa 242-0007 Japan

電話番号 046-277-0540

ファクシミリ番号 046-278-0320

第VI欄 優先権主張

☐ 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている

先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願：国名	広域出願：*広域官庁名	国際出願：受理官庁名
(1) 25. 08. 1999	平成11年特許願 第237818号	日本国 Japan		
(2)				
(3)				

☒ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関（ISA）の選択

先の調査結果の利用請求：当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合）

出願日（日、月、年）

出願番号

国名（又は広域官庁）

ISA / JP

第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 5 枚
 明細書（配列表を除く）..... 33 枚
 請求の範囲 3 枚
 要約書 1 枚
 図面 0 枚
 明細書の配列表 8 枚
 合計 50 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙
☒ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
☒ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
2. ☐ 別個の記名押印された委任状
3. ☐ 包括委任状の写し
4. ☐ 記名押印（署名）の説明書
5. ☐ 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する）
6. ☐ 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する）
7. ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
8. ☒ スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク）
9. ☒ その他（書類名を詳細に記載する）
 陳述書、フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

間山 世津子



間山 進也



林 茂則



受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であって

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA / JP

6. ☐

調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月：再版2000年1月)

P C T

手数料計算用紙

願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

受理官庁の日付印

出願人又は代理人の書類記号

FP00-004PCT

出願人

工業技術院長が代表する日本国

所定の手数料の計算

1. 及び 2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第 18 条第 1 項第 1 号の規定による手数料（注 1）
（送付手数料 [T] 及び調査手数料 [S] の合計）

90,000 円 T + S

3. 国際手数料（注 2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 50 枚

最初の 30 枚まで

40,700 円 b 1

20 × 940 =

18,800 円 b 2

30 枚を越える用紙の枚数 用紙 1 枚の手数料

b 1 及び b 2 に記入した金額を加算し、合計額を B に記入

59,500 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注 3） 5

5 × 8,800 =

44,000 円 D

支払うべき指定手数料
の数（上限は 8）
（注 4）

1 指定当たりの手数料

B 及び D に記入した金額を加算し、合計額を I に記入

103,500 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T + S 及び I に記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

193,500 円

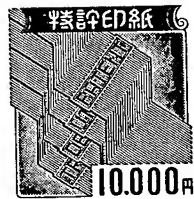
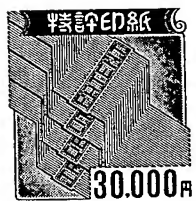
合 計

（注 1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注 2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注 3）願書第 V 欄でレ印を付した□の数。

（注 4）指定数を記入する。ただし、8 指定以上は一律 8 とする。



送付手数料・調査手数料

90,000円

ご利用明細

本日はご来店いただきありがとうございます。

年月日 120822		時刻 14.11	取扱店番 260108	銀行番号 0260	支店番号 1091689	口座番号 1091689	印紙税申告納 付につき廻町
お取引内容 お振込	お取引金額 ¥103,500*	お取引回数 お取引回数	残高	お取扱金額 ***			
ご案内 お受取人 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA 様 ご依頼人 マヤマ ハヤシコウツウキマシメツツキヨシメシヨ マヤマ セツコ 様				税込手数料 210円をご利用口座からいただきました			

かわいい人形も貯まていく。
ベストパートナーサービス
ディズニーキャラクターズプラン

詳しくは
裏面へ!

- 残高欄の金額は決済未承認の証券類を含んでいます。
- 残高の頭部に「-」がある場合は、お借入れ残高を表わします。

東京三菱銀行



基本手数料	59,500円
指定手数料	44,000円
合 計	103,500円



陳述書

特許庁長官 殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成12年8月24日

国際出願の表示 24.08.00 提出の国際出願

発明の名称 自然環境からの特定機能微生物およびその遺伝子の
検出・定量方法、新規16S rRNA遺伝子情報および
プローブ

代理人

(09812)

弁理士 間山 世津子

MAYAMA Setsuko



フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

1. 出願人名称 工業技術院長が代表する日本国
JAPAN AS REPRESENTED BY SECRETARY
OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND
TECHNOLOGY
2. 代理人氏名 (09812) 間山 世津子
MAYAMA Setsuko
3. 国際出願の表示 24.08.00 提出の国際出願
4. 発明の名称 自然環境からの特定機能微生物およびその遺伝子
の検出・定量方法、新規16S rRNA遺伝子情
報およびプローブ
5. 使用した文字コード テキスト形式
6. 配列を記載したファイル名 配列表FP00-004PCT.TXT
7. 連絡先
電話番号 046(277)0540
担当者氏名 間山 世津子



明 細 書

自然環境からの特定機能微生物およびその遺伝子の検出・定量方法、新規 16S rRNA 遺伝子情報およびプローブ

技術分野

本発明は、自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出・定量する方法、新規16S rRNA遺伝子情報およびその利用に関する。

背景技術

海洋中には石油を分解する微生物が生息し、石油流出事故のあった油濁海域ではその微生物の活動により石油が分解され、時間とともに自然浄化されていく。これまで、石油の自然浄化を左右する物理化学的要因の解明を通し、様々な処理手法や処理技術が開発されてきている（R.P.J. Swannell, K. Lee and M. Mcdonagh, Microbiol. Rev., 60: 342-365, 1996）が、自然浄化の担い手である微生物群集の構成や群集変動に関する解明はほとんど行われていない。そのため、処理技術の有効性やその普遍性を評価することが困難な状況にある。また、培養条件下で効率的に石油分解を行う微生物を微生物製剤として汚染海域に導入し浄化を促進しようという試みもあるが、人為的に導入した微生物製剤の自然界における安全性や有効性についての評価は十分に行われていない。

石油や有害化学物質汚染現場の分解微生物をモニタリングするためには、培養法による分解微生物の計数、並びに現場試料からの集積培養法や平板培養法による微生物の分離・培養、および分離した微生物の分解性を評価するための培養物中の石油の分析などに多くの労力と時間を要する。また、きわめて重要なことは、自然界に生息する微生物の内、現在上記のように分離・培養できる微生物は 1% 以下でしかないということである。従って、上記のように従来の分離・培養法に依存した石油分解細菌や有害化学物質分解細菌のモニタリング法のみでは、現場微生物の 1% 程度を対象としたモニタリングしかできず、汚染現場で石油や有害化学物質の分解に関わる大半の難分離微生物に対するモニタリングはできない。

また、最近石油以外にPCB、トリクロロエチレンなどの有害化学物質による土壌・地下水汚染の浄化に、それらの有害物質を分解する微生物を利用したバイオレメディエーションの開発が進められている（児玉 徹ら編：地球をまもる小さな生き物たちー環境微生物とバイオレメディエーションー、技報堂出版、1995、八木修身ら：バイオレメディエーションの水域環境への適応、（日本水産学会監修（石田祐三郎、日野明德編）：生物機能による環境修復ー水産における Bioremediation は可能かー、恒星社厚生閣、p. 9- 21, 1996）。しかし、バイオレメディエーション過程における微生物群集や分解微生物の挙動などについてはほとんど解明されていない。

本発明は、石油や有害化学物質などで汚染された現場環境で優占する石油や有害化学物質などの汚染物質分解微生物を解明する手法、およびそれらの微生物を利用した環境浄化・修復技術の開発を進める上で不可欠な石油や有害物質等の汚染物質分解微生物、並びに自然環境中から酵素等有用物質生産微生物を検出するための材料および方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、マイクロプレート MPN、ダイレクト PCR およびシーケンシングを組み合わせた手法により、石油汚染現場の試料から遺伝子レベルで石油分解細菌を検出・定量し、かつ顕微鏡を用いた直接計数法によりその数を全菌数と比較して優占度を把握するという新規なモニタリング手法を開発した。この手法は、石油分解細菌の分離を必要としないこと、また分離が困難な微生物も含めて石油分解細菌のモニタリングが可能なこと等から、従来の問題を克服することができる。さらに、本発明の上記手法は、平板培養分離法によらず分子・細胞レベルで、有害化学物質等の汚染物質を分解する微生物や酵素等の有用物質生産微生物などの特定機能微生物の検出・定量を行い、それら特定機能微生物の環境中での優占度や挙動等の解析に応用できる新規モニタリング手法や新規有用微生物のスクリーニング手法として有用である。

また、本発明者らは、上記の手法により、1997年1月2日の日本海におけるナホトカ号石油流出事故後の同年1月15日に油濁海水

中に優占していた微生物の16S rDNA領域の塩基配列を決定することで、現場環境で優占していた石油分解細菌の16S rDNAの塩基配列情報の分子系統学的な特徴を明らかにした。また、培養法によらず分子・細胞レベルにおいて微生物検出を行うため、得られた塩基配列情報に基づいて前記微生物のみを特異的に標識可能なDNAプローブの開発にも成功した。

本発明は、これらの知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明の要旨は、以下の通りである。

(1) 自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法であって、以下の工程：

1) 自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行った後、増殖した特定機能微生物の計数を行う一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行い、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物数の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、

2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出し、該 DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、

3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および

4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程

を含む前記方法。

(2) 特定機能微生物および全従属栄養微生物の計数を MPN 法により行い、全菌数の計数を直接顕微鏡計数法により行い、特定機能微生物の増殖を顕微鏡観察により判定する(1)記載の方法。

(3) 特定機能微生物が特定の化学物質を分解する微生物である(1)または(2)記載の方法。

- (4) 特定の化学物質が有害化学物質である(3)記載の方法。
- (5) 特定の化学物質が石油および石油成分である(3)記載の方法。
- (6) (1)または(2)記載の方法を用いて、自然環境に優占している微生物の遷移を解析することにより、自然環境の微生物群集機能を評価する方法。
- (7) (1)または(2)記載の方法を用いて、汚染環境を解析・評価する方法。
- (8) (3)または(4)記載の方法を用いて、有害化学物質汚染環境を解析・評価する方法。
- (9) (5)記載の方法を用いて、油濁環境を解析・評価する方法。
- (10) 特定機能微生物が有用酵素生産微生物である(1)または(2)記載の方法。
- (11) 配列番号1～4のいずれかの塩基配列を有する16S rDNA。
- (12) 配列番号1～4のいずれかの塩基配列の一部を有し、*Cycloclasticus*属の石油分解細菌と特異的にハイブリダイズしうる、塩基長10～50 bpのRNAまたはDNAプローブ。
- (13) 配列番号1～4のいずれかの塩基配列の一部が配列番号5、6および7の塩基配列からなる群より選択される(12)記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (14) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌を検出または定量するための(12)または(13)に記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (15) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌が*Cycloclasticus pugetii*またはその近縁種である(14)記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (16) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌をスクリーニングするための(12)または(13)に記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (17) *Cycloclasticus*属の石油分解細菌が*Cycloclasticus pugetii*またはその近縁種である(16)記載のRNAまたはDNAプローブ。
- (18) (12)または(13)記載のRNAまたはDNAプローブを用いて、

Cycloclasticus 属の石油分解細菌を検出または定量する方法。

(19) *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である (18) 記載の方法。

(20) (12) または (13) 記載の RNA または DNA プローブを用いて、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌をスクリーニングする方法。

(21) *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である (20) 記載の方法。

(22) 配列番号 1~4 のいずれかの塩基配列との相同性、または (12) または (13) 記載の RNA または DNA プローブを用いた DNA/DNA または DNA/RNA ハイブリダイゼーションにより *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定する方法。

(23) *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である (22) 記載の方法。

本発明は、1) 自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行った後、増殖した特定機能微生物の計数を行う一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行い、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物数の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出し、該 DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む、自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法を提供する。この方法において全菌数の計数を行うことは、対象とする自然環境試料中での微生物群集全体の大きさ（母集団の大きさ）を知る上で不可欠なものであり、その中での特定機能微生物の優占度を見積もる工程において大変重要な意味をもつ。

ここで、「自然環境」とは、地球上の生物圏を意味し、海洋や湖沼、河川、排水処理環境等の水圏、土壌や陸上地下、海底地下等の地圏、地球表層のような気

圈等、微生物が生息している地球上全ての環境をいう。

「特定機能微生物」とは、自然環境に生息する微生物の中で、その機能が培養や遺伝子解析により特定化された微生物のことをいい、例えば、石油、トクロロエチレン、PCB、ダイオキシン等有機塩素化合物、環境ホルモン物質（アルキルフェノール、ビスフェノール A、フタル酸エステル等）、有機水銀、シアン化合物、有機スズ化合物などの有害化学物質を分解する微生物、およびキチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、リグニン等の分解酵素や各種抗生物質等の有用物質を生産する微生物などを例示することができる。

「特定機能微生物の遺伝子」とは、上記特定機能微生物が保有する遺伝情報のことをいい、たとえばその機能の発現に関与する遺伝子や、リボゾーマル RNA 遺伝子（rDNA）やトポイソメラーゼ遺伝子等の分類学的な基準遺伝子の中でその特定機能微生物を特定化しうる塩基配列情報などを例示することができる。

「特定機能微生物およびその遺伝子の検出および定量」とは、上記特定機能微生物やその遺伝子を、特異的に検出し定量（計数）することを言う。特定機能微生物を検出・定量する場合、培養に用いる基質利用能の有無に基づき増殖の有無として特異的な検出が可能であり、培養前に試料を段階希釈しておくことにより計数（定量）が可能である。また、この計数を可能とした培養液より微生物の遺伝子や細胞を取り出し解析することにより、定性的な解析（微生物の同定や特定遺伝子の検出）が可能となる。

すなわち、遺伝子を抽出してシーケンサーによりその塩基配列を解読し、分子系統解析や相同性解析等を行うことにより、その微生物の同定や特定遺伝子の検出を行うことができる。このような段階希釈選別・培養を行うことにより、通常の PCR 時に問題となる増幅エラーを低減させたより正確で定量的な遺伝子解析が可能となる。また、その特定機能微生物に特異的な DNA/RNA プローブや抗体等を用いることにより、ハイブリダイゼーション手法や抗体に標識した物質（蛍光物質や酵素等）を仲介させた検出手法等を用い、細胞レベルや分子レベル（細胞を破碎して試料調製した場合）でその存在を検出することができる。したがって、これらの定性的な解析過程で、試料中にその遺伝子塩基配列や抗原等の標的物質の存在が確認された場合、その存在は上記特定機能微生物の計数の場合と同

様に、標的物質を保有する微生物数として計数し定量化することができる。

上記の方法において、まず、自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行う。

「自然環境から採取した微生物含有試料」とは、微生物が生息する地球上の生物圏から採取した試料をいい、例えば、大気、海洋、湖沼、河川、土壌、陸上地下、海底地下などから採取した水、土壌、底泥、岩石などの試料、および微生物が共存、共生している微細藻類、大型藻類、動物プランクトン、各種動植物などの試料を例示できる。

微生物含有試料の段階希釈は、例えば、以下のようにして行うことができる。まず、微生物がその他の生物と共存、共生していたり微生物が大きな集塊を形成していることが想定される場合には、段階希釈の前に用いる試料（試料が個体の場合は滅菌した初期希釈液）中において、たとえば数分間のボルツェックスミキサー処理や1分程度の超音波洗浄処理等を行い、顕微鏡観察により微生物細胞の分散を確認しながらできるだけ試料中の微生物を遊離、分散させておく。次に、その微生物含有試料を滅菌希釈液で段階希釈する。たとえば、10 ml スケールで10 倍の段階希釈を行う場合、滅菌希釈液（例えば、海洋由来の試料では人工海水や天然海水、淡水由来試料では蒸留水等、動植物由来試料では生理食塩水等、この他それぞれの培養に用いる培養液）を滅菌した試験管等に 9 ml ずつ分注し、その試験管に微生物含有試料 1 ml を加え、よく振とう・攪拌する。これを一次希釈試料液（希釈倍率 10^1 倍、 10^{-1} 試料）とする。ついで、この一次希釈試料液 1 ml を新たな滅菌希釈液 9 ml に加えて、十分攪拌・振とうし、これを二次希釈試料液（希釈倍率 10^2 倍、 10^{-2} 試料）とする。以下、この操作を n 回繰り返すことにより、 n 次希釈試料液（希釈倍率： 10^n 倍、 10^{-n} 試料）を得ることができる。このように、10 倍段階希釈の場合、試料液と希釈液の比率は 1 : 9 であればよい。

各段階希釈物は、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養される。例えば、特定機能微生物が石油または有害化学物質を分解する微生物である場合には、石油または有害化学物質を炭素源とする培地で各段階希釈物を培養する。ここで、

「培養」とは、段階希釈物中に存在する微生物を生育・増殖させることをいい、培養は、温度、湿度、pH、栄養源の種類および量等の培地組成などが制御された

状態で行われるとよい。

培養後、増殖した特定機能微生物の計数を行う。特定機能微生物の計数は、例えば、液体培地を用いる MPN 法（清水 潮：MPN 法による一般従属栄養細菌数の測定。沿岸環境調査マニュアル II－水質・微生物篇。日本海洋学会編、恒星社厚生閣、p.281、1990）および/または寒天やシリカゲル等で固化させた固体培地を用いる平板計数法により行うことができる。ここで、特定機能微生物として一般の好気性微生物を対象とする場合には、ガス置換をしない通常の方法で培地調製し培養すればよい。また、培地およびそれを入れる試験管や容器中より空気を窒素ガス等で置換し、酸素混入のない条件で培養することにより、各種嫌気性微生物を計数の対象にすることも可能である。このうち、MPN 法は、検出感度が他の方法より高いので好ましい。

具体的には、培地 9 ml を含む培養試験管を上記に示した試料の各希釈段階ごとに 3 本または 5 本ずつ準備しておく。試料中の微生物数により 4～6 段階程度の希釈試料を準備する。微生物数が多いと見込まれる場合には、事前に希釈した試料を培養計数に用いてもよい。MPN 法の場合、希釈段階は 10 倍となる。この培養試験管に、前記微生物含有試料の段階希釈で調製した各希釈段階の試料を 3 本または 5 本の培養試験管にそれぞれ 1 ml ずつ加える。この試験管を微生物の至適な培養温度、例えば 20℃ で一定時間培養し、培地の濁りなどで菌の増殖を判定する。得られた結果から、MPN 計数表（3 本法または 5 本法）によって試料中の微生物数を算出する。

ここで、石油分解菌や有害化学物質分解菌を特定機能微生物として MPN 計数する場合、唯一の炭素源として石油や有害化学物質を上記培地に加えることによって計数することができる。また、キチナーゼ等有用酵素生産微生物の場合、培地の炭素源を目的とする酵素の基質（キチナーゼの場合はキチン等）にすることによって計数できる。

上記において、微生物の増殖の判定には、増殖に伴い生じる菌体の濁りの有無で判定するのがふつうであるが、増殖に伴う培地組成の変化（たとえば、pH や基質濃度の減少、生成物の増大等）で判定することもできる。また、希釈倍率の高い試料で、用いる培地組成や培養条件等により菌体増殖の程度や培地組成の変

化が乏しい場合には、試料中の菌体の有無を直接顕微鏡観察して判定することが望ましい。直接顕微鏡観察は、直接顕微鏡計数法（後述）に準拠して行えばよい。ただし、この場合、試料中の菌体の有無の判定を目的としており、試料を添加しない場合のコントロール値より有為な細胞数の検出が確認できればよい。

上記において、特定の基質を用いて増殖が陽性と判定された試料の内、最も希釈倍率の高い試料については、その希釈直後、すなわち培養前に存在していた特定機能微生物の細胞数は、理論的には1～9細胞、種類数も1～9種類となる。したがって、通常の寒天平板を用いた培養手法での分離が不可能であっても、この増殖陽性と判定された最も希釈倍率の高い液体培養試料には、増殖によりそれ以上の数の微生物が存在していることになり、これを対象としてDNAレベルでの解析を行う場合、PCR時のエラーの問題が軽減できるという利点がある。実際には、遺伝子解析手法（後述）を用いることにより、その種類を高い精度で効率的に推定することが可能となり、採取した原試料中にいた微生物の細胞数とその種類に関する情報が一度に得られるという利点がある。

上記の段階希釈、培養および特定機能微生物の計数の一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行う。

「微生物含有試料中の全菌数」とは、試料中に存在する全微生物細胞数のことで、実際には細胞密度（単位容量あたりの細胞数）として表す。

全菌数の計数は、例えば、ホルマリン等で細胞固定した試料を染色せずに血球計数板等を用いてそのまま計数したり、各種DNA蛍光染色剤を用いて染色した細胞をフローサイトメータ計数したりすることもできるが、より正確には直接顕微鏡計数法により行うことができる。

このうち、直接顕微鏡計数法は、環境微生物の全菌数計数法として最も信頼性の高い手法であり、これに用いるDNA特異的染色剤によりアクリジンオレンジ法（J.E. Hobbie et al., Appl. Environ. Microbiol., 33:1225-1228, 1977）やDAPI法（K.G. Porter and Y.S. Feig, Limnol. Oceanogr., 25: 943-948, 1980）等がある。細胞を染色しない場合には、環境試料中に多数存在する微生物以外の粒子を計数してしまう危険性が高く、また染色して機械的に計数する場合でも、微生物

細胞を直接認識しないため擬似染色された粒子を計数してしまう可能性が高い。したがって、簡便性と信頼性の点で、直接顕微鏡計数法を用いることが最も好ましい。

以下に、直接顕微鏡計数法具体的な作業例を示す。試料を採取後、直ちに中性ホルマリン（最終濃度 2% 程度）を加えて固定し冷蔵庫保存する。それを小分けした試料に対し、DAPI 溶液（4',6-diamidino-2-phenylindole）を終濃度 0.5 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$ で添加し 5 分間程度細胞を染色する。次に、染色した微生物細胞を、黒色色素で染色された孔径 0.2 μm の Nuclepore フィルターで濾過し、フィルター上に細胞を捕集する。このフィルターをピンセットで取り外し、あらかじめ 1 滴の蛍光顕微鏡用エマルジョンオイルを落としたスライドグラス上に濾過面を上にしたままのせる。次いで、1 滴のエマルジョンオイルをこのフィルター上に落とし、カバーグラスをかぶせる。こうして得られたプレパラート上に、さらに 1 滴のエマルジョンオイルを置き、油浸で落射型蛍光顕微鏡下で観察し計数する。全菌数は下記の計算から求める。

全菌数 (cells/ml) = (1 方形中の平均細菌数 \times フィルター上の濾過面積) / (試料水中の濾過量 (ml) \times 方形の面積)

ここで方形とは、接眼レンズ中に挿入したマイクロメータを通して観察される正方形のグリッド視野の大きさのことを意味する。

「従属栄養微生物」とは、増殖に際し、他の生物がつくった有機化合物を細胞構成成分として必須とする微生物をいう。

全従属栄養微生物の計数は、例えば、固体培地を用いる寒天平板法や液体培地を用いる MPN 法により行うことができる。特定機能微生物の計数を MPN 法で行う場合には、全従属栄養微生物の計数も MPN 法で行うことが好ましい。一般の自然環境水試料を対象とした従属栄養細菌計数の場合、MPN 法では平板法よりも通常多くの生菌数が数えられることから、検出感度の点でも平板法より好ましい。

具体的に、全従属栄養微生物を MPN 法で計数する場合、培地として従属栄養

微生物用培地（たとえば実施例 1 に示した 1/2TZ 培地）を用い、前述のように一定時間培養し、培地の濁り等で菌の増殖を判定し、得られた結果から MPN 計数表によって試料中の全従属栄養微生物数を算出するという手順で行うことができる。

そして、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する。具体的には、同じ自然環境から同時に採取した同一試料を測定対象として用い、直接顕微鏡計数手法によって得られた全菌数を分母とし、MPN 法等によって得られた特定機能微生物数を分子とすることにより、その優占度を見積もる。この場合、理論的に特定機能微生物数は個々の細胞を認識して計数した全菌数を上回ることではなく、常に 0～100% の幅で優占度を見積もることが可能である。また、全菌数に代え、MPN 法等によって得られた全従属栄養細菌数を分母におくことにより、全従属栄養細菌に占める特定機能微生物の割合を求めることもできる。さらに、同じ自然環境から同時に複数の試料を採取し、それぞれ同一試料を用いて上記測定を行い、平均値や標準偏差を求める等の統計処理を行うことにより、対象とした自然環境中での特定機能微生物の優占度の信頼性を向上させることができる。

また、特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出する。

微生物からの DNA の抽出は、公知の方法（例えば、M. G. Murray and W. F. Thompson, *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325, 1980 に記載されている方法）により行うことができる。

抽出した DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする。

「特定の遺伝子領域」としては、16S rDNA の他、5S, 18S, 23S rDNA 等のリボゾーマル RNA 遺伝子、トポイソメラーゼ遺伝子、エロンゲーションファクター遺伝子、二酸化炭素固定酵素遺伝子およびその微生物の基質特異性に関与する酵素等の特定機能遺伝子などを例示することができる。

特定の遺伝子領域の増幅およびクローニングは、公知の方法（例えば、増幅については J. Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 14.1-14.35, 1989、

クローニングについては D. Kaufman and G. Evans, BioTechniques, 9: 304-406, 1990 に記載されている方法) により行うことができる。実際には、無作為に数十クローン試料を選抜し、それら試料中に目的とする特定の遺伝子領域の全長が含まれているかどうかをゲル電気泳動解析により確認する。たとえば、増幅した特定遺伝子領域の全長が 2 kbp である場合、ゲル電気泳動上でも 2 kbp 近辺の位置にバンドが形成され確認できる。

次いで、クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する。

具体的には、上記により獲得したクローン試料、望ましくは 30 以上の試料を、EcoRI や ApaI、XbaI 等いくつかの制限酵素を用いて断片化した後、ゲル電気泳動解析によりこれらの制限酵素断片長の多型性 (RFLP) パターンの異同を調べる。ここで、異なる RFLP パターンを示した試料は異なる塩基配列情報を有すると考えられることから、この工程により、クローン試料を大まかにグループ化するとともに可能な限り同一クローン試料を除外することで試料を選別し、DNA シークエンサーを用いてその塩基配列を決定する。また、この RFLP パターン解析に基づく試料選別のみならず、DNA プローブを用いたハイブリダイゼーション解析等によっても、その異同（この場合、プローブが標的とする塩基配列の相同性）を事前に調べることができ、違いの大きい（相同性の低い）試料を塩基配列解析の対象として選別することができる。前述のように、本発明の手法では、これらの選別過程においては、理論上最大でも 9 種のグループが出現するのみである。ここで、もし 9 種以上のクローン試料が出現した場合には、クローニング過程で用いた微生物が保有する酵素による不可抗力的な塩基置換の可能性も否定できないが、その違いが多岐にわたる場合には、段階希釈－培養計数時における判定ミスの可能性が高いと判断でき、さらにより希釈度の高い試料を対象に優占的な微生物の検出を行うことができる。

最後に、決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する。具体的には、GeneBank や EMBL、DDBJ 等のデータベースより各分類群にまたがるいくつかの代表種の塩基配列情報を入手し、Clustal W (version 1.7, Des Higgins, 1997) や Se-Al (version 1, Andrew Rambaut, 1996) のようなプログラムを用いて多重アラインメント処理（解析対象とする複数の塩基配列

間で塩基の挿入や欠損箇所を削除し、相互に置換の有無のみを示す配列の集合体とするような再配列化処理)をした後、下記に示す分子系統解析や相同性解析を行い、その分子系統上の近縁性や塩基配列の相同性から既存種のどれに近いかを判定し同定する。

同定される微生物は、自然環境から採取した試料中に存在するものであるが、前述したように、希釈倍率の高い試料で検出・同定されるものであれば、その自然環境で優占していた微生物である確率が非常に高い。さらに、自然環境から採取した同一試料について、前述した全菌数や従属栄養細菌数を測定しておけば、より科学的にその優占度を%表記することが可能となる。例えば、石油汚染現場から採取した試料の場合には、上記の方法により、現場に優占する石油分解細菌を同定し、かつ全菌数や全従属栄養細菌数との比較により、その優占度を%表記することができる。

ここで「同定」とは、培養可能な微生物を対象とした現代的な分類・同定の工程の中で、塩基配列情報に基づく分子系統解析の工程のみを指し、解析対象とする微生物の遺伝子について、類縁微生物種のそれと分子系統学上の同一性または近縁性を証明するという行為である。分子系統解析手法としては、近隣結合法(NJ法: N. Saitou and M. Nei, *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425, 1987) および/または最節約法(MP法: W.M. Fitch, *Syst. Zool.*, 20: 406-416, 1971)、最ゆう法(ML法: J. Felsenstein, *J. Mol. Evol.*, 17: 368-376, 1981)を用いることができる。実際には、NJ法による解析はClustal W (version 1.7, Des Higgins, 1997) や PHYLIP (J. Felsenstein, version 3.57c, 1995) 等、MP解析はPAUP* (D. L. Swofford, test version 4.0d63)等、ML解析はMOLPHY (version 2.3b; J. Adachi and M. Hasegawa, *Computer science monographs*, no. 28. Tokyo Institute of Statistical Mathematics, 1996) 等のソフトウェアを用いて実施することができる。これらの分子系統解析の結果、入手したクローンのいくつかが系統樹上で既存種とは明確に異なる操作上の分類ユニット (Operational Taxonomic Unit) の一群 (クラスター) を形成した場合 (経験的な目安として、その分岐の再現性確率を示すブートストラップ値が70~80%以下の場合)、それは分子系統学上新規グループと判断され、分類学上でも新種の可能性が高いと考えることができる。

本発明の上記の方法においては、さらに、この同定の精度を向上させるため、相同性解析などの工程を含むことが好ましい。この相同性解析は、対象とする塩基配列領域において、個々に塩基配列が決定され相互に比較可能な領域、望ましくはその遺伝子の全領域の塩基配列の数を分母とし、その中で塩基配列が完全一致するものの数を分子として%計算する方法により、たとえば Genentyx-MAC 8.0 解析ソフト (Genetic Information Processing Software 社製) を用いて解析できる。特に、16S rDNA の全領域を対象とし、その相同性が 97% 以上である場合、それらを互いに同一種と推定することが国際基準として提唱されている (E. Stackebrandt and B.M. Goebel, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849, 1994) という点で有利である。一方、分子系統解析および相同性解析の上から同一種と推定される場合においても、本工程により得られる相同性が 100% を下回った場合、同一種の中での塩基配列の多様性の幅や亜種の存在を示唆するものとなる。これは、入手した新しい塩基配列情報やデータベース上の既存情報から種特異的塩基配列を選抜し、そのプローブを設計するといった派生的な作業を行う上で、重要な参照データになり得ることを意味する。

特定機能微生物は特定の化学物質を分解する微生物であってもよく、特定の化学物質としては、石油および石油成分、トリクロロエチレン、PCB、ダイオキシンなどの有機塩素化合物、環境ホルモン物質 (洗剤に使用されているアルキルフェノール、主にポリカーボネート樹脂等の原料ビスフェノール A、プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステル)、有機水銀、シアン化合物、有機スズ化合物などの有害化学物質を例示することができる。石油 (広義には、一般に原油と呼ばれる。) 中に存在する主要な炭化水素は、化学構造によって大きく飽和炭化水素と芳香族炭化水素に分類される。前者はさらに n-パラフィンと分枝パラフィン等のパラフィン類と単環と多環のシクロパラフィンを含むシクロパラフィン (ナフテン) 類に分けられる。後者は単環と多環の芳香族炭化水素に分けられる (東原孝規、月刊海洋、30 巻、10 号、613-621、1998)。一般にこのような原油中に含まれる炭化水素を分解する微生物を石油分解微生物という (J.G. Leahy and R.R. Colwell, *Microbiol. Rev.*, 54: 305-315, 1990, R.M. Atlas and R. Bartha, *Adv. Microbiol. Ecol.*, 12: 287-338, 1992)。

また、特定機能微生物は、特定の有用酵素生産微生物であってもよく、特定の酵素としては、キチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼ、リグニン分解酵素などを例示できる。

上記の方法を用いて、自然環境に優占している微生物の遷移を解析することにより、その自然環境の微生物群集機能を評価することができる。ここで、「微生物群集機能」とは、対象とした自然環境中に生息する複数種の微生物により営まれる総体としての機能のことをいう。ここで言う微生物の種類とは、通常のカテゴリー単位である種であることが好ましいが、実験上の機能単位、たとえば PCB 分解菌群という一つの機能単位であってもよい。したがって、特定機能微生物一種のみの機能を微生物群集機能とは呼ばない。また、微生物群集内の異種微生物間の相互作用は、共生と呼べるほどの強い場合やただ存在しているだけの場合が考えられるが、その各々全てを特定することが困難であることから、その試料中に見いだされた全ての微生物による総合的な機能のことを微生物群集機能と呼ぶ。

実際には、一種のみで、現在知られている微生物機能の全てを備えた微生物は存在しないことから、そこで見出された微生物たちは栄養物や酸素等の生育に影響を及ぼす諸要因をめぐりそれぞれに固有のニッチ（生態学的地位）をもち、その大多数が相互に弱い連携関係にあるものと考えることができる。この微生物群集機能の存在は、たとえば、滅菌海水を用いた培養条件では良好な増殖を示す微生物でも、同じ海水を滅菌せず自然のまま用いた培養条件では同様の増殖が見られないということからも容易に推定できる。

また、石油の分解をめぐっては、脂肪族炭化水素を分解する微生物や芳香族炭化水素を分解する微生物以外にも、それらの分解中間代謝産物を炭酸ガスまで分解する過程には多くの微生物が関与しており、これらの微生物にビタミン等の微量必須栄養素を供給する微生物等も共存しているものと考えられ、複数種の微生物が協同して石油を無機化、無毒化しているものと考えることができる。この場合、ある分解産物が生育阻害物質になりうる場合には、その分解産物を利用可能な微生物と共存することにより分解効率は上昇するものと考えられ、微生物群集全体として高い分解機能が発現されることになる。

具体的には、前述した方法により微生物群集内の一種または複数種の特定機能

微生物、たとえば好気性の炭化水素分解菌や PCB 分解菌、タンパク質分解菌、グルコース資化性菌等および嫌気性の硫酸還元菌やメタン生成菌等の優占度を調べておき、その経時的な変動を調べることにより、各々の特定機能微生物の遷移を解析することができる。その結果、たとえば、沿岸表層水において、ある時期に硫酸還元菌の優占度が上昇していれば、その時の微生物群集は潜在的に硫酸還元機能が低いと評価できるし、その原因として、試料採取以前に台風や地殻活動等による海底堆積物の巻き上がりや嫌気的な廃水の流入等により、それらが通常の嫌気的な生息環境から移入してきたものと推定することができる。

また、上記の方法を用いて、汚染環境を解析・評価することができる。たとえば、対象とする特定機能微生物が、あるパルプ工場の排水中に特異的に優占する従属栄養細菌である場合、ある時期にその優占度が上昇していれば、その環境はこの排水に汚染されている可能性が高いと判断できるし、その優占度の変化を長期間モニターしその遷移の周期性や季節性を把握していれば、その変化が突発的なものであるかどうか、またその負荷が人為的なものかどうかを評価することができる。

さらに、上記の方法を用いて、有害化学物質汚染環境を解析・評価することができる。たとえば、対象とする特定機能微生物が PCB 分解菌である場合、ある時期にその優占度が上昇していれば、その環境は PCB 汚染されている可能性が高いと判断できるし、その微生物群集は総体として PCB 分解機能が高まっていると判定できる。さらに、その優占度の変化を長期間モニターしその遷移の周期性や季節性を把握していれば、その変化が突発的なものであるかどうか、その負荷が工場排水の流入等人為的なものかどうかを推定することができる。

また、上記の方法を用いて、油濁環境を解析・評価することができる。たとえば、対象とする特定機能微生物が石油成分由来のもの、たとえばテトラデカンやアントラセンの分解菌である場合、ある時期にその優占度が上昇していれば、その環境は石油等で汚染されている可能性が高いと判断できるし、その微生物群集は総体としてその石油成分の分解機能が高まっていると判定できる。さらに、その優占度の変化を長期間モニターしその遷移の周期性や季節性を把握していれば、その変化が突発的なものであるかどうか、その負荷が船舶事故等に起因した人為

的なものかどうかを推定することができる。

また、上記の方法を、有用酵素や抗生物質等の有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニングに応用することもできる。例えば、培地の炭素源としてキチン、脂質、リグニン、セルロース、キシランなどを用いると、それを分解する酵素（キチナーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、キシラナーゼなど）を生産する微生物が増殖して、その遺伝子を検出、定量することができる。また、通常のペプトンおよび酵母抽出物などから構成される培養液等を用いて微生物を増殖させ、その生産物の中に抗生物質等有用物質が含まれているかどうかを調べることにより、有用物質生産微生物の検出、定量を行うことができる。

また、最近では、上記酵素等の有用物質生産遺伝子の塩基配列が解明され、データベースが構築されている。したがって、本方法は、試料中に最も優占している微生物の有する遺伝情報を解明し、その塩基配列と既存の酵素等有用物質生産遺伝子データベース上の塩基配列とを対比させることによって、有用物質の検索を可能にするものである。さらに、目的とする酵素等の有用物質生産遺伝子の塩基配列を有する微生物数を定量的に把握することもできる。これは、自然界から有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニングを行う上できわめて有効である。

従来、これら酵素等の有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニングには、各種の分離源試料から、酵素の基質となるセルロース、キチン等を唯一の炭素源とした培地を用いて、集積培養法や寒天平板法等により、多数の微生物を分離し、さらに分離菌株の有用物質生産性を試験するなど、多大な労力を要した。

以上のように、本発明は、自然環境中の微生物群集の中から、平板分離法での分離が困難な微生物であっても、酵素等有用物質生産遺伝子塩基配列を有する微生物を定量的に検出し解析することを可能にする方法を提供するものである。したがって、本発明は、従来の方法に比べて効率的かつ利便性が大きく、これまで対象とされていなかった平板培養分離が困難な有用物質生産微生物の検出、定量およびスクリーニング手法としてもきわめて有益である。

上記の方法により、1997年1月2日に起こった日本海重油流出事故により大量の重油が漂着した福井県三国町沿岸域の表層海水から、配列番号 1

～4の塩基配列を有する16S rDNAの遺伝子情報が得られた。この遺伝子情報から、現場環境に優占していた石油分解細菌は、*Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種であることがわかった。すなわち、後述の実施例に記載のように、上記石油流出事故後の油濁海域における微生物群集の中から、C重油を唯一の炭素源とした液体培地でのMPN培養計数法により優占していた石油分解細菌を選別し、次いで、選別した石油分解細菌の培養細胞からDNAを抽出し、このDNAを鋳型として適当なプライマー（例えば、16S rDNAの保存領域に対応するプライマー）を用いてPCRを行い、PCR反応液を電気泳動にかけることにより、配列番号1～4の塩基配列を有する16S rDNAを得、この16S rDNAの塩基配列をオートシーケンサーにより決定した。この遺伝情報を用い、前述の分子系統解析や相同性解析を行い、この現場で優占していた石油分解菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種に由来するものと同定した。

配列番号1～4の塩基配列情報に基づいて、種々の用途に適したRNAおよびDNAプローブを設計することができる。プローブの塩基配列および長さは用途に応じて、適宜選択すればよい。例えば、FISH法 (fluorescence *in situ* hybridization) により、試料（例えば、石油流出事故後の石油で汚染された区域の海、河川、湖沼などの水）中の *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌を検出または定量したり、多数の微生物群の中から *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌をスクリーニングするためには、配列番号1～4の塩基配列の塩基番号823～853の領域 (*Escherichia coli* の16S rDNAの塩基配列における5'末端からの位置 (ナンバーリングシステム) では、829～866の領域) などから選択される領域に対応する塩基長10～50 bp、好ましくは塩基長15～25 bpのプローブを設計するとよい。一例として以下のプローブを挙げることができる。

- (1) 5'-GGAAACCCGCCCAACAGT-3' (Cyclopug829-846*, 18mer) (配列番号5)

3'-CCTTTGGGCGGGTTGTCA-5'

(2) 5'-TGCACCACTAAGCGGAAACC-3' (Cyclopug847-866*, 20mer) (配列番号6)

3'-ACGTGGTGATTCGCCTTTGG-5'

(3) 5'-GGAAACCCGCCCAACAGTTGCACCACTAAGCGGAAACC-3'
(Cyclopug829-866*, 38mer) (配列番号7)

(なお、* (数字) は *Escherichia coli* の 16S rDNA 塩基配列における 5'末端からの位置 (ナンバーリングシステム) を示す (H.F. Noller and C. R. Woese, Science, 212:403-411, 1981) 。

(3) のプローブの塩基配列は、(1) と (2) のプローブの塩基配列が隣接したものであるが、この場合はプローブが自己結合する可能性があるので注意が必要になる。

プローブは、公知の方法、例えば、ホスホルアミド法またはトリエステル法により合成することができる。あるいは、DNA 自動合成機により合成してもよい。

また、プローブは、アイソトープ (^{32}P 、 ^{35}S など)、蛍光色素 (ビオチン/アビジン、ジゴキシゲニン/抗ジゴキシゲニン-ローダミン、Fluorescein-isothiocyanate (FITC)、LuciferYellow CH、Rhodamine 123、Acridine orange、Pyronin Y、Ethidium bromide、Propidium iodide、Ethidium homodimer、BOBO-1、POPO-1、TOTO-1、YOYO-1、Carboxyfluorescein diacetate (CFDA)、Fluorescein diacetate (FDA)、Carboxyfluorescein diacetate-acetoxymethylester (CFDA-AM)、5-cyano-2,30ditolyl tetrazolium chloride (CTC)、Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)、Sulforhodamine 101 acid chloride (Texas Red)、Cy3、Cy5、Cy7、2-hydroxy-3-naphtoic acid-2'-phenylanilide phosphate (HNPP) など)、ジゴキシゲニン等の抗原物質などで標識するとよい。もし抗原物質で標識した場合には、酵素免疫学的な手法を用い、基質の酵素分解を経て生じる化学発光や蛍光を検出すればよい。

本発明の RNA または DNA プローブを用い、種々のハイブリダイゼーション法 (サザンブロット法、ノーザンブロット法、コロニーハ

イブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、*in situ* ハイブリダイゼーション（例えば、FISH 法）など）により、*Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌を検出または定量したり、スクリーニングすることができる。

本発明の DNA プローブを用いて、石油流出事故現場の海水から石油分解細菌を検出・定量する方法の一例について以下に説明する。石油流出事故現場の海域から海水を採取し、この海水中に存在する微生物をフィルター（孔径 $0.2\mu\text{m}$ ）に固定し、これを蛍光色素等で標識した配列番号 5 の塩基配列を有する DNA プローブとハイブリダイズさせ、プローブを洗い落とした後、蛍光顕微鏡で観察して、DNA プローブとハイブリダイズした細菌（石油分解細菌）の検出または計数を行う。

また、本発明の DNA プローブを用い、コロニーハイブリダイゼーション手法、ドットプロットハイブリダイゼーション手法、フローサイトメトリー法などにより、多数の微生物群の中から *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌をスクリーニングすることができる。

さらに、配列番号 1～4 の塩基配列との相同性、または配列番号 1～4 の塩基配列情報に基づいて設計した RNA または DNA プローブを用いた DNA/DNA または DNA/RNA ハイブリダイゼーションにより、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定することができる。ここで、「同定」とは、配列番号 1～4 のように対象とする遺伝子のほぼ全領域の塩基配列を解析した場合には、その塩基配列間での相同性の計算を意味する。また、上記のようにして設計した分類学的に特異的な塩基配列（この場合、*Cycloclasticus* 属の微生物で、特に *Cycloclasticus pugetii* という種およびその近縁種に特異的な塩基配列）をもつプローブを用いる場合には、対象とする遺伝子試料がもつ塩基配列間とのハイブリダイゼーション試験のことを意味する。

相同性の計算は、対象とする遺伝子の塩基配列領域、望ましくはその全領域に

において、個々に塩基配列が決定され相互に比較可能な領域の塩基配列の数を分母とし、その中で塩基配列が完全一致するものの数を分子として%計算する方法により、たとえば Genentyx-MAC 8.0 解析ソフト (Genetic Information Processing Software 社製) を用いて行うことができる。

配列番号 1 ~ 4 の塩基配列の相同性により *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定するには、16S rDNA の塩基配列に基づく種の一般的な判断基準に従うとよい。すなわち、16S rDNA のほぼ全領域を対象とし、その相同性が 97% 以下である場合には、便宜的に異種と判断することができる (E. Stackebrandt and B.M. Goebel, Int. J. Syst. Bacteriol., 44: 846-849, 1994)。

たとえば、ある微生物の 16S rDNA の塩基配列について、配列番号 1 ~ 4 の塩基配列との相同性を Genentyx-MAC 8.0 (前出) のような解析ソフトを用いて計算した場合、その数値が 97% 以上の場合は同種と判断され、それが 97% 未満の場合には異種と判断される。

しかし、一部の分類群では、97% 以上の相同性があっても、異種と定義されている場合もある。たとえば、*Vibrio cholerae* と *Vibrio mimicus* の間では相同性が 98.9~99.4% もあることが知られている (清水と塚本：海洋細菌の分類と同定。海洋微生物とバイオテクノロジー、清水潮編。技報堂出版、pp.1-24, 1991)。また、*Vibrio* 科の海洋細菌を対象とした研究では、種の範囲は相同性が 99.3% 以上の集団であり、97% 以上の相同性をもった集団は属の範囲だと推測されている (清水と塚本：前出)。したがって、この 97% 以上の相同性という基準を根拠とした同定は、あくまで便宜的なものと考え、予め対象とする分類群についての種と相同性の関係を調べてから適用することが必要である。

具体的には、*Cycloclasticus* 属細菌の場合、*C. pugetii* の 1 種しか正式に種の認定がされていないため、97% の相同性が見られた場合には、便宜的に当該種と同定される。しかし、前述した *Vibrio* 属細菌の例を見ても明らかなように、今後の研究を必要とする当該属のような場合、97% 程度ではまだ異種の可能性が十分残されている。

RNA または DNA プローブを用いた DNA/DNA または DNA/RNA ハイブリダイゼーションにより、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を

同定するには、以下のようにするとよい。

同定に用いるハイブリダイゼーション手法としては、ドットプロットハイブリダイゼーション手法 (H. E. N. Bergmans and W. Gaastra, *New Nucleic Acid Techniques* (J. M. Walker ed.); *Methods in Molecular Biology*, vol. 4, Clifton, Humana press, pp. 385-390, 1983) やコロニーハイブリダイゼーション手法 (M. Grustein and D.S. Hogness, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 3961-3965, 1975)、サザンプロットハイブリダイゼーション手法 (E. M. Southern, *J. Mol. Biol.*, 98: 503-507, 1975)、蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション (またはホールセルハイブリダイゼーションとも言う) 手法 (R. I. Amann et al., *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169, 1995) などを用いることができる。これらのハイブリダイゼーション解析に用いる微生物からの DNA/RNA 試料の調製は、それぞれの文献に記載された公知の方法で行うことができる。

ここで、どのハイブリダイゼーション手法を用いるかによらず重要なことは、用いるプローブとそれが標的とする遺伝子塩基配列を有する標準菌株試料との間で、たとえば D. A. Stahl and R. Amann (*Development and application of nucleic acid probes. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.). John Wiley and Sons, West Sussex, pp.205-248, 1991*) などに記載された方法に基づき、ハイブリダイゼーションの温度条件や用いる緩衝液中のフォルムアミド濃度条件を推定し、事前に厳密なハイブリダイゼーション条件、理想的には 100% に満たない相補性の場合にはハイブリダイゼーション過程とその後の洗浄過程で遊離してしまう条件を実験的に決定しておくことである。

このようにして決定したハイブリダイゼーション条件に基づき、上記のような標的とする標準菌株やそれとは分類学上大きく離れた別の標準菌株からの遺伝子試料を対象試料として用い、未知試料に対してハイブリダイゼーションを行う。その結果、プローブに直接標識された放射性元素や蛍光物質または抗原 (この場合、その抗体に結合させておいた酵素作用を利用する) に起因して生ずる放射能や蛍光、化学発光等 (抗原-抗体-酵素検出系の場合には、用いる酵素基質を変えることで検出系を選択できる) の強度を測定し、対象試料のそれと対比する。

得られた未知試料でのハイブリダイゼーションの強度が、標的とする標準菌株のそれと同等であり、分類学上大きく離れたものとの間に大きな差が認められた場合（理想的には測定限界以下の強度しか検出できない場合）、この未知試料は標的微生物と同一種と同定またはその近縁種と特定することができる。

また、例えば、上記プローブの塩基配列（DNA 断片）をプライマーとして用いて、PCR を行うことによって菌種の同定を行うこともできる。すなわち、同定の対象となる菌体を溶菌して、上記プローブの塩基配列をもつ DNA 断片をプライマーとして添加した後、PCR 増幅する。その PCR 産物を電気泳動等により解析し、16S rDNA の増幅が確認されれば、対象とした菌には、用いた DNA 断片に相補的な遺伝子部位が存在していることになる。すなわち、配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA を持つ微生物と同種の菌であることが特定できる。

本発明の方法により、検出、スクリーニングあるいは同定された *Cycloclasticus* 属の微生物、特に、*Cycloclasticus pugetii* およびその近縁種の石油分解細菌は、微生物製剤（例えば、石油分解用微生物製剤）として利用することができる。

また、本発明の 16S rDNA やプローブの塩基配列情報を利用して、石油分解細菌の自然界や石油処理条件下における挙動を解明し、油濁海域への栄養塩などの添加あるいはこの石油分解微生物の散布により石油分解効率を賦活化するといった環境修復技術（バイオレメディエーション技術）の開発を図ることができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願平 11-237818 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

〔実施例 1〕

（1）重油流出事故現場海域における石油分解微生物等の調査

1997 年 1 月 2 日に起こった日本海重油流出事故により大量の重油が漂着した福井県三国町沿岸域の表層海水を汚染直後の 1 月 15 日に採取し、プランクトンネット（目合い：約 $30\mu\text{m}$ ）でろ過した後、マイクロプレート MPN（M-MPN）計数法により、現場表層海水中的の石油分解微生物を計数した。M-MPN 計数は、1/10NP 培地（ NH_4NO_3 , 100mg; Ferric citrate, 2mg; K_2HPO_4 , 2mg; Aged seawater, 800ml; Distilled water, 200ml; pH7.8）を 1.8ml ずつ分注した 24 穴マイクロプレートのウエル中で供試海水を 10 倍段階希釈後、唯一の炭素源として、n-テトラデカン、灯油および C 重油を各 $10\mu\text{l}$ 添加し、 20°C で培養した。この MPN 計数は 3 本法で行った。増殖の判定は各ウエルの培地の濁度や浮遊する石油の変化などを菌無接種の対照ウエルと比較して行った。並行して、基本的には Porter と Feig の方法（K.G. Porter and Y.S. Feig, *Limnol. Oceanogr.*, 25:943-948, 1980）に準じて全菌数の計数、ならびに 1/2TZ 培地（Polypeptone, 2.5g; Bacto-Yeast extract, 0.5g; HEPES, 4.77g; Kester's artificial seawater, 900ml; Distilled water, 100ml; pH7.5）を用いた M-MPN 計数による従属栄養細菌の計数を行った。また、事故直後の 1997 年 1 月 15 日から約 1 年間にわたり、季節ごとに表層海水を採取し、上記方法により海水中的の全菌数を直接顕微鏡計数法、従属栄養細菌数や石油分解細菌数を MPN 法により調べた。

その結果、油流出現場海域の全菌数は 1 年を通し 10^5cells/ml オーダーレベルで特に大きな変動はみられなかったが、石油分解細菌数は大きく変動した。すなわち、流出油漂着直後の現場海水中的の n-テトラデカン、灯油、C 重油分解細菌数は、約 $10^3\sim 10^4\text{ MPN/ml}$ （全菌数に対する分解細菌数の比率（優占度）：1~10%）と高い値を示したが、同海域で約 2 ヶ月後では $10\sim 10^3\text{ MPN/ml}$ （優占度：0.01~1%）と著しく減少した。一方、従属栄養細菌数は、汚染直後は 10^4 MPN/ml 以上、約 2 ヶ月後においてもほぼ同程度の $10^4\sim 10^5\text{ MPN/ml}$ の値を示した。これらのことから、石油流出事故直後の現場微生物群集は、水温が $12\sim 13^\circ\text{C}$ と低い冬季であるにもかかわらず、石油成分に対する分解機能を通常より著しく高めていると判断された。

（2）現場海域に優占する石油分解微生物の選別

上記事故直後の 1997 年 1 月 15 日に採取した現場表層海水試料を用い、1/10NP

培地に C 重油を添加し M-MPN 計数に用いたウエルの中で、増殖が陽性と判定される最も高い希釈段階のウエル（増殖陽性フロント試料）の中から石油分解微生物試料を採取した。この微生物試料は、現場微生物群集を 10 倍段階希釈法により限界まで絞り込んだものの培養液であることから、この中の微生物は現場油濁海域で最も優占していたものと考えることができる。

（３）選別した石油分解微生物からの DNA の抽出

増殖陽性フロント試料を遠心分離により集菌し、567 μ l の TE バッファー（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0）に懸濁した。この懸濁液に 30 μ l の 0.01% sodium dodecyl sulfate (SDS) と 3 μ l の 20mg/ml Proteinase K 溶液を加え、37℃で 1 時間インキュベートした。次いで、5M NaCl を 100 μ l 加えよく攪拌し、65℃で 10 分間インキュベートした後、クロロホルム：イソアミルアルコール混合液（24:1）を 700 μ l 加え、穏やかに攪拌した。遠心後、上層（水層）を分取し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（20:24:1）を当量加え穏やかに攪拌した。遠心後、その上層（水層）を分取し、0.6 容のイソプロパノールを加え、DNA を遠沈した。その DNA は 70%エタノール（-20℃）で洗浄した後、乾燥させ 100 μ l の TE バッファーに溶解した。

（４）クローニング

（３）により回収・精製した DNA をテンプレートとして 16S rRNA 遺伝子の保存領域に対応するプライマー 27f および 1525r を用いて、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。

27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'（配列番号 8）

1525r: 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'（配列番号 9）

この PCR 産物（16S rDNA）は、電気泳動によりその存在を確認した後、Original TA Cloning(r) kit（Invitrogen Co.）を用いて、クローニングを行った。

（５）RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）解析

まず、無作為に 40 クローンを選び出し、それらクローンに 16S rRNA 遺伝子の全長がインサートされているかを確認した。その結果、17 クローンが 16S rRNA 遺伝子の全長がインサートされていることがわかった。次に、それら 17 クローンを、現場海域で優占していたと考えられる石油分解菌群集の大まかな傾向をつ

かむため、5種類の制限酵素（*EcoRI*、*HindIII*、*SaII*、*XbaI* および *RsaI*）を用いて、RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）解析によりグルーピングした。その結果、各制限酵素において、1～3種類の切断パターンが得られた。最終的には、5種類の制限酵素によるそれぞれの断片パターンから4グループに分かれた。

（6）フルシークエンシング

（5）の RFLP 解析によりグループに分けられた4グループから各1クローン、合計4クローン（CHO11-1-1、CHO11-1-2、CHO11-1-4、CHO11-1-34）を選抜し、16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定した。

シーケンスは、RNA シーケンスキット（Thermo SequenaseTM fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP、アマシャム社製）を用いて、オートシーケンサー（ALFred DNA Sequencer、ファルマシア社製）によりシーケンスを行い、16S rDNA の塩基配列を決定した。

（7）分子系統解析

決定した4クロンの16S rDNA の塩基配列情報より、予備検索として Ribosomal Database Project (RDP) II（イリノイ大学）の検索エンジンを用いて、それらと類似の配列情報をもつ微生物の存在を調べた。次いで、この類似の配列ならびに各分類群の代表菌株の配列をデータベース（GenBank や EMBL、DDBJ 等）から入手（ダウンロード）し、Clustal W（前出）や Se-Al（前出）プログラム等を用いて、この4クロンの16S rDNA の塩基配列とともに多重アラインメント処理を行った。このアラインメントデータ（約1500 bp）を対象に、PHYMLIP（前出）プログラムを用い、NJ 法（前出）による分子系統解析および100回反復によるブートストラップ解析を実施した。

その結果、1997年1月に起こった日本海重油流出事故直後の表層海水に優占していた石油分解微生物は、Proteobacteria の γ サブグループに属する細菌で、*Cycloclasticus pugetii* (*C. pugetii*) と非常に近縁のものであることが判明した。また、16S rDNA 塩基配列のほぼ全長を対象とした相同性解析の結果、この4クロンの内の3クローン（CHO11-1-2、CHO11-1-4、CHO11-1-34）は、*C. pugetii* のそれ（GenBank No.: U12624）と99%前後（記載順に99.2%、98.8、99.1%）

の相同性を、しかし、他の1クローン（CHO11-1-1）は、それより低い相同性（97.2%）しか見られないことがわかった。したがって、これら4クローンは、*C. pugetii*と同種またはその近縁種に由来する配列と推定された。*C. pugetii*と同種またはその近縁種と判断された4クローン（CHO11-1-1、CHO11-1-2、CHO11-1-4、CHO11-1-34）の16S rDNA塩基配列を、それぞれ配列番号1～4に示す。

上述した4クローンと非常に近縁と判断された *Cycloclasticus pugetii* は、最近、米国太平洋岸のポリ塩化ビフェニールで汚染されている海底堆積物から分離された芳香族炭化水素分解能を有する微生物として報告されている（S.E. Dyksterhouse et al., Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 116-123, 1995）。そこで、本属種の標準菌株（ATCC 51542）を入手して調べた結果、この微生物はビフェニール等の特殊な有機物を添加した培地でのみ増殖するという特徴をもっており、それらを添加した平板培養では微小コロニーしか生成せず、通常の従属栄養微生物用培地では平板培養分離が困難であることが判明した。

一方、本発明の16S rDNA塩基配列情報は、石油流出事故直後の油濁海水中微生物試料から初めて発見されたものであり、海底堆積物からでも、ポリ塩化ビフェニール汚染海域からでもない点で大きな特徴を有する。これは、上述したように、*C. pugetii* またはその近縁種の分離が大変困難であることに起因するものと推測されるが、今後、本発明に記載されたような方法等により、世界中の海域で広く検出される可能性がある。

得られた16S rDNA塩基配列（配列番号1～4）は、石油汚染現場よりC重油を唯一の炭素源として用いた段階希釈培養液試料より得られたものであることから、それらはC重油中の炭化水素成分を分解し増殖した微生物に由来する遺伝子塩基配列情報と考えることができる。また、上述したように、これらの配列情報を有していた微生物は、芳香族炭化水素の分解能を有する *Cycloclasticus pugetii* に分子系統学上近縁であり、相互に高い相同性を有していることも示された。したがって、この配列番号1～4の塩基配列を有する微生物で、*C. pugetii* またはそれに近縁の微生物は、難分解性の多環芳香族炭化水素等の分解機能を有する細菌と考えることができる。このことは、配列番号1～4の遺伝子情報が、石油流

出現場の微生物相を調べる上で、また、その微生物相や該遺伝子情報を有する微生物の分布密度から石油の汚染状況やその分解状況を解析する上で、きわめて有効であることを意味している。

すなわち、流出原油や流出重油中の難分解性多環芳香族炭化水素は、易分解性脂肪族炭化水素等に比べ長期間汚染海域に残留するため、これら難分解性多環芳香族炭化水素を分解して増殖していた可能性が高い微生物由来の配列番号 1～4 の塩基配列情報は、実際の石油汚染沿岸環境やその汚染現場での石油汚染浄化修復プロセスをモニタリングする上で、きわめて有効な指標として利用できるものである。また、配列番号 1～4 の塩基配列情報は、*Cycloclasticus pugetii* またはそれに近縁の微生物に由来すると推測されるが、既知のものとは 100% の相同性を示さず新規な配列情報を含んでいる。したがって、この分類群において種またはグループ特異的なプローブを作製する上でも、きわめて有益なものと判断される。

さらに、以上のような一連の解析手法、すなわちマイクロプレート MPN/ダイレクト PCR/シーケンシング手法は、現場海域に優占する石油分解微生物を解析するのに非常に有効であることが明らかになった。

〔実施例 2〕

(1) *Cycloclasticus pugetii* に種特異的な配列の選択 (プローブデザイン)

実施例 1 で行った分子系統解析の結果を用い、16S rRNA の高次構造を考慮して、*C. pugetii* に特異的な配列を選択した (プローブデザインを行った)。デザインした 2 種類のプローブ (Cyclopug829-846 と Cyclopug847-866) を以下に示す。

◆プローブ Cyclopug829-846

5'-GGAAACCCGCCCAACAGT-3' (829-846*, 18mer) (配列番号 5)

(3'-CCTTTGGGCGGGTTGTCA-5')

◆プローブ Cyclopug847-866

5'-TGCACCACTAAGCGGAAACC-3' (847-866*, 20mer) (配列番号 6)

(3'-ACGTGGTGATTTCGCCTTTGG-5')

ここで、*は、*Escherichia coli* の 16S rDNA 塩基配列における 5'末端からの位置（ナンバーリングシステム）を示す。

（２）データベースによるプローブチェック

（１）でデザインしたプローブの特異性を確認するため、データベース（Ribosomal Database Project II, RDP）を用いて、プローブマッチ検索を行った。検索エンジンは、RDP に付属されているものを使用し、ミスマッチ配列を 2 塩基の条件で行った。その結果、デザインした 2 つのプローブとも RDP 上の *Cycloclasticus* 属 6 株のみとマッチし、ミスマッチ配列が 1 塩基もなく完全に一致した。また、2 つのプローブとも自己結合しないことが確認された。これらの *Cycloclasticus* 属 6 株は、2 株が *C. pugetii* で、残りの 4 株は *Cycloclasticus* sp. で未同定株か未承認種の株である。参考までに、RDP 上でマッチした *Cycloclasticus* 属 6 株の由来を表 1 に示す。

表 1 RDP に登録されている *Cycloclasticus* 属細菌の由来

Source	DataBase accession no.	Reference
<i>Cycloclasticus pugetii</i> str. PS-1(T)ATCC51542	U12624	1
<i>Cycloclasticus pugetii</i> str. PS-1(T)ATCC51542	L34955	1
<i>Cycloclasticus</i> sp. N3-PA321	U57920	2
<i>Cycloclasticus</i> sp. G	AF093002	3
<i>Cycloclasticus</i> sp. E	AF093003	3
<i>Cycloclasticus</i> sp. W	AF093004	3
<i>Cycloclasticus</i> sp. (<i>oligotrophus</i>)	AF148215	4

1. DYKSTERHOUSE et al., Int. J. Syst. Bacteriol., 43:116-123, 1995
2. GEISELBECHT et al., Appl. Environ. Microbiol., 62:3344-3349, 1996
3. GEISELBECHT et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:4703-4710, 1998
4. BUTTON et al., Appl. Environ. Microbiol., 64:4467-4476, 1998

ここで、*Cycloclasticus* 属の 16S rDNA 塩基配列情報としては、7 件 6 株のも

のが RDP データベース上に登録されている。この中で、IJSB (International Journal of Systematic Bacteriology) や IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) 等に発表され正式に種と認められているものは、*C. pugetii* のみであり、現状では一属一種の分類群である。表 1 中、*C. oligotrophus* は未承認種で、*C. pugetii* との違いは明確でない (当該配列間の相同性は 99.3%)。

以上のことから、今回、油濁環境由来の微生物 16S rDNA 塩基配列からデザインした 2 つのプロープは、*Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種と非常に高い特異性をもっていることが明らかになった。

〔実施例 3〕

デザインしたプロープと *Cycloclasticus pugetii* の標準菌株 ATCC51542 が特異的にハイブリダイズすることを Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法により確認した。

(1) プロープの合成と標識

実施例 2 において、データベースにより特異性が確認されたプロープの Cyclopug829-846 及び Cyclopug847-866 を DNA 合成機により合成し、常法により精製した。それらのプロープ Cyclopug829-846 及び Cyclopug847-866 の 5'末端を Tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) でラベルした。

(2) 供試菌株の培養と固定

C. pugetii の標準菌株 ATCC51542 を America Type Culture Collection (ATCC) から入手し、ポリ塩化ビフェニルを添加した 1/2TZ 培地 (前述) を用いて、20℃で培養した。また、対照菌株として、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)、*Bacillus marinus* (*B. marinus*)、*Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*) および *Psychrobacter immobilis* (*Psy. immobilis*) の 4 種菌の標準菌株を、菌株保存機関が推奨する培地と温度で培養した。それぞれの培養細胞は、3%(w/v) パラホルムアルデヒド / 3 x PBS (NaCl, 24.0g; KCl, 0.6g; Na₂HPO₄, 4.32g; KH₂PO₄, 0.72g) 溶液 (pH 7.2-7.4) で固定し、遠心分離により集菌した後、3xPBS バッファーで洗浄した。さらに、対照プロープとしては、分子系統樹

における Bacteria ドメインに特異的なプローブ EUB338 (R.I. Amann et al., J. Bacteriol, 172: 762-770, 1990) を供した。

(3) ハイブリダイゼーション

(2) で前処理を行った *C. pugetii* と 4 種類の対照菌株の細胞をそれぞれゼラチンコーティング (0.1% gelatine, 0.01% $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$) してあるスライドガラスに滴下し、室温で乾燥させ、スライドガラス上に固定した。その後、50 と 80、100%エタノールを用いて脱水した。

スライドガラスの試料上にハイブリダイゼーションバッファー (0.9M NaCl, sodium sulphate buffer [pH 7.2], 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], 5mM EDTA 1mg/ml Denhalt solution \times 10 Poly (A)) 15 μ l を滴下した後、プローブを 5ng/ μ l となるように添加して、ハイブリチャンバー内 (湿潤状態) で 45°C、4.5 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ終了後、スライドガラス上を 5ml の洗浄バッファー (50mM sodium phosphate buffer [pH 7.0], 0.1%SDS, 0.9M NaCl) で洗い流し、50ml の洗浄バッファー中に 42°C、30 分間浸した。その後、蒸留水で洗浄し風乾した。次いで、試料上に 1~5 μ g/ml の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を添加して室温で 5 分染色した。蒸留水で洗浄した後、風乾し退色防止剤を滴下し、スライドガラスを被せ封入した。観察は、蛍光顕微鏡 (Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて UV 励起、B 励起および G 励起で行った。

その結果を表 2 に示す。今回デザインしたプローブ Cyclopug829-846 および Cyclopug847-866 の場合、UV 励起では各細胞中 DNA に DAPI が普遍的に結合した結果として、DAPI 由来の青色蛍光が *C. pugetii* および対照菌株として供した 4 種類 (*P. aeruginosa*, *B. marinus*, *V. parahaemolyticus* および *Phy. immobilis*) とも観察することができた。しかし、同視野を G 励起で観察すると、*C. pugetii* のみがプローブ Cyclopug829-846 および Cyclopug847-866 と相補的な配列を持つため、プローブの 5'末端をラベルした TRITC 由来の赤色蛍光を発した。

表 2

Cycloclasticus pugetii またはその近縁種に特異的な DNA プローブの有効性

供試標準菌株	供試プローブ		
	Cyclopug829-846	Cyclopug847-866	EUB338
<i>Cycloclasticus pugetii</i>	○*	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	×**	×	○
<i>Bacillus marinus</i>	×	×	○
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	×	×	○
<i>Psychrobacter immobilis</i>	×	×	○

*, ハイブリダイズし、顕微鏡観察において、蛍光を発したことを示す。

**, ハイブリダイズせず、顕微鏡観察ができなかったことを示す。

一方、Bacteria ドメインに特異的なプローブ EUB338 の場合は、B 励起での観察においても *C. pugetii* および 4 種類の対照菌株とも、それぞれ EUB338 の 5' 末端をラベルした FITC 由来の緑色蛍光を発した。

以上のことから、今回、油濁環境由来の微生物 16S rDNA 塩基配列からデザインした 2 つのプローブは、*Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種を特異的に検出する上で、その高次構造に起因する結合上の妨害も見られず、実際に大変有効であることが示された。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

本発明により、自然環境（例えば、石油汚染時の現場環境など）で優占する微生物を解明する手法が提供された。

また、本発明の手法により解析された 16S rDNA の塩基配列情報は、油濁環境で優占する能力を有する天然の石油分解微生物に由来すると考えられる。従って、この遺伝子およびこの遺伝子情報に基づいて本微生物の特異的な検出を可能にす

るように設計された DNA プローブの塩基配列情報は、この石油分解微生物の自然界や石油処理条件下における挙動を解明し、油濁海域への栄養塩などの添加あるいはこの石油分解微生物の散布により現場石油分解効率を賦活化するといった環境修復技術（バイオレメディエーション技術）の開発を図る上で、きわめて大きな利便性がある。

本発明により、自然環境（例えば、石油や有害化学物質によって汚染された現場環境など）に優占する微生物やバイオレメディエーション過程における分解微生物の挙動を解明する手法が提供された。

さらに、本発明は、微生物を平板培養分離するという手法によらず、特定機能を有する微生物または微生物群を液体培養で選別し、その機能や系統分類学的位置を遺伝子レベルで解析する方法を提供するものである。従って、上記分解機能を有する微生物のみならず、これまで分離が困難であった酵素等有用物質を生産する微生物の検出、定量およびスクリーニングにも有益である。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 ～ 4 は、16S rDNA の塩基配列を示す。

配列番号 5 ～ 7 は、プローブの塩基配列を示す。

配列番号 8 および 9 は、プライマーの塩基配列を示す。

請 求 の 範 囲

1. 自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法であって、以下の工程：

1) 自然環境から採取した微生物含有試料を段階希釈し、特定機能微生物が増殖しうる条件下で培養を行った後、増殖した特定機能微生物の計数を行う一連の操作と並行して、前記微生物含有試料中の全菌数の計数を行うとともに、全従属栄養微生物の計数を行い、全菌数および／または全従属栄養微生物数に対する特定機能微生物数の比率から、自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、

2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物から DNA を抽出し、該 DNA を鋳型として特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、

3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および

4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む前記方法。

2. 特定機能微生物および全従属栄養微生物の計数を MPN 法により行い、全菌数の計数を直接顕微鏡計数法により行い、特定機能微生物の増殖を顕微鏡観察により判定する請求項 1 記載の方法。

3. 特定機能微生物が特定の化学物質を分解する微生物である請求項 1 または 2 記載の方法。

4. 特定の化学物質が有害化学物質である請求項 3 記載の方法。

5. 特定の化学物質が石油および石油成分である請求項 3 記載の方法。

6. 請求項 1 または 2 記載の方法を用いて、自然環境に優占している微生物の遷移を解析することにより、自然環境の微生物群集機能を評価する方法。

7. 請求項 1 または 2 記載の方法を用いて、汚染環境を解析・評価する方法。
8. 請求項 3 または 4 記載の方法を用いて、有害化学物質汚染環境を解析・評価する方法。
9. 請求項 5 記載の方法を用いて、油濁環境を解析・評価する方法。
10. 特定機能微生物が有用酵素生産微生物である請求項 1 または 2 記載の方法。
11. 配列番号 1～4 のいずれかの塩基配列を有する 16S rDNA。
12. 配列番号 1～4 のいずれかの塩基配列の一部を有し、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌と特異的にハイブリダイズしうる、塩基長 10～50 bp の RNA または DNA プローブ。
13. 配列番号 1～4 のいずれかの塩基配列の一部が配列番号 5、6 および 7 の塩基配列からなる群より選択される請求項 12 記載の RNA または DNA プローブ。
14. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を検出または定量するための請求項 12 または 13 に記載の RNA または DNA プローブ。
15. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 14 記載の RNA または DNA プローブ。
16. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌をスクリーニングするための請求項 12 または 13 に記載の RNA または DNA プローブ。
17. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 16 記載の RNA または DNA プローブ。
18. 請求項 12 または 13 記載の RNA または DNA プローブを用いて、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を検出または定量する方法。
19. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 18 記載の方法。
20. 請求項 12 または 13 記載の RNA または DNA プローブを用いて、*Cycloclasticus* 属の石油分解細菌をスクリーニングする方法。
21. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項 20 記載の方法。

22. 配列番号1の塩基配列との相同性、または請求項12または13記載のRNAまたはDNAプローブを用いたDNA/DNAまたはDNA/RNAハイブリダイゼーションにより *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌を同定する方法。

23. *Cycloclasticus* 属の石油分解細菌が *Cycloclasticus pugetii* またはその近縁種である請求項22記載の方法。

要 約 書

1) 自然環境における特定機能微生物の優占度を推定する工程、2) 特定機能微生物の増殖が陽性と判定される最も希釈段階の高い培養液中の微生物の特定の遺伝子領域を増幅し、クローニングする工程、3) クローニングした遺伝子領域の異同を調べ、その塩基配列を決定する工程、および4) 決定した塩基配列情報から、自然環境下に生息する特定機能微生物を同定する工程を含む、自然環境から特定機能微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法。配列番号1～4のいずれかの塩基配列を有する16S rDNA。配列番号1～4のいずれかの塩基配列の一部を有し、*Cycloclasticus*属の石油分解細菌と特異的にハイブリダイズする、塩基長10～50 bpのRNAまたはDNAプローブおよびその利用法。

配 列 表

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

Nishimatu Construction CO.,LTD

NYK LOGISTICS TECHNOLOGY INSTITUTE

<120> A method for detecting or quantifying bacteria having a specific function and the genes thereof from natural environment, novel 16 S rDNA gene information, and probes

<130> probe

<140>

<141>

<150> JP P1999-237818

<151> 1999-08-25

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1532

<212> DNA

<213> Cycloclasticus pugetii

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1532)

<400> 1

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcgcatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggaaacagaa tgcagcttgc tagcaggcgg tcgagtggcg gacgggtgag ttatgcatag 120
gaatccgccc gatagtgggg gacaacctcc tgaaaacgct gctaataccg cataatcccg 180
cgggggcaaa gacggggacc ttcgggcctt gctctaattg atgagcctac aggggattag 240
gtagtgtgtg aggtaacggc tcaccaaggc aacgatccct agctggtttg agaggatgat 300
cagccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat 360
tgcacaatgg aggaaactct gatgcagcaa tgccgctgt gtgaagaagg ccttaggggtt 420
gtaaagcact ttcagtaggg aggaaaagtt taagggtaat aacccttagg ccctgacgtt 480
acctacagaa gaagcaccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtatac ggagggtgca 540
agcgtaatc ggaattactg ggcgtaaagc gcgcgcaggc ggtaaatac gtcagatgtg 600
aaagccccgg gctcaacctg ggaactgcat ttgaaactgg ctagctagag tgtggtagag 660
gagagtggaa ttccaggtgt agcggtgaaa tgcgtagata tctgaaggaa caccagtggc 720
gaaggcggct ctctggacca aactgacgc tgaggtgcga aagcgtgggt agcaaacggg 780
attagatacc ccggtagtcc acgccgtaaa cgatgtcaac taactgttgg gcgggtttcc 840
gcttagtggt gcastaacgc aataagttga ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa 900
actcaaata attgacgggg gccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgatgca 960
acgcgaagaa ccttacctac ccttgacata cagagaactt tctagagata gattggtgcc 1020
ttcgggaact ctgatacagg tgctgcatgg ctgtcgtcag ctctgtcgt gagatgttgg 1080
gttaagtecc gtaacgagcg caacccttat ccttagttgc taccatttag ttgggcactc 1140
taaggagact gccggtgata aaccggagga aggtggggac gacgtcaagt catcatggcc 1200
cttatgggta gggctacaca cgtgctacaa tggccggtac agagggccgc aaactcgcga 1260
gagtaagcta atcccttaaa gccggtccta gtccggattg cagtctgcaa ctgactgca 1320
tgaagctgga atcgtagta atcgcggatc agaatgccgc ggtgaattcg ttccggggcc 1380
ttgtacacac cgccgctcac accatgggag tgggttgcaa aagaagtggg taggctaacc 1440

ttcgggaggc cgctcaccac tttgtgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc 1500
cctaggggaa cctggggctg gatcacctcc tt 1532

<210> 2

<211> 1538

<212> DNA

<213> *Cycloclasticus pugetii*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1538)

<400> 2

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcggcatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
ggaaacgatg ctagcttgct agcaggcgctc gaggggcgga cgggtgagta atgcatagga 120
atctacctaa tagtgtggga caacctggtg aaaaccaggc taataccgca taatccctac 180
ggggcaaagc agggggacctt cgggccttgc gctaatagat gagcctatgt cggattagct 240
agttggtgag gtaatggctc accaaggcaa cgatccgtag ctggtttgag aggatgatca 300
gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg 360
cacaatggag gaaactctga tgcagcaatg ccgcgtgtgt gaagaaggcc ttagggttgt 420
aaagcacttt cagtagggag gaaaagtta aggttaataa ccttagggcc tgacgttacc 480
tacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc acagccggcg gtaatacgga ggggtgcaagc 540
gttaatcgga attactgggc gtaaagcgcg cgtaggcggt taaacaagtc agatgtgaaa 600
gccccgggct caacctggga actgcatttg aaactgttta gctagagtgt ggtagaggag 660
agtggaattt caggtgtagc ggtgaaatgc gtagatatct gaaggaacac cagtggcgaa 720
ggcggctctc tggaccaaca ctgacgtga ggtgcgaaag cgtgggtagc aaacgggatt 780
agataccccg gtagtccacg ccgtaaacga tgtcaactga ctgttggcg gggttccgct 840
tagtggtgca staacgcaat aagttgaccg cctggggagt acggccgcaa ggctaaaact 900
caaatgaatt gacgggggccc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960

cgaagaacct tacctacct tgacatacag agaactttct agagatagat tggcgccttc 1020
 gggaactctg atacaggtgc tgcattggctg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
 aagtcccgtg acgagcgcaa ccttatacct tagttgctac catttagttg ggcactctaa 1140
 ggagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcac catggccctt 1200
 atgggtaggg ctacacacgt gctacaatgg ccggtacaga gggccgcaaa ctgcgcgagag 1260
 taagctaate ccttaaagcc ggtcctagtc cggattgcag tctgcaactc gactgcatga 1320
 agctggaatc gctagtaate gcggatcaga atgccgcgtt gaattcgttc ccgggccttg 1380
 tacacaccgc ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaaaag aagtgggtag gctaacttcg 1440
 ggaggccgct caccactttg tgattcatga ctggggtgaa gtcgtaacaa ggtagcccta 1500
 ggggaacctg gggctggatc acctcctt 1538

<210> 3

<211> 1532

<212> DNA

<213> *Cycloclasticus pugetii*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1532)

<400> 3

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggccggcatgc ctaacacatg caagtcgaac 60
 ggaaacgatg ctagcttgct agcaggcgtc gaggggcgga cgggtgagta atgcatagga 120
 atctacctaa cagtggggga caacctggtg aaaaccagsc taataccgca taatccctaa 180
 cgggcaaagc aggggacctt cgggccttgc gctaatagat gaggctatgt cggattagct 240
 agttggtgag gtaatggccc accaaggcaa cgatccgtag ctggtttgag aggatgatca 300
 gccacactgg gactgagaca cgcccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaatattg 360
 cacaatggag gaaactctga tgcagcaatg ccgcgtgtgt gaagaaggcc ttagggttgt 420
 aaagcacttt cagtagggag gaaaagttaa aggttaataa ccttaggccc tgacgttacc 480

tacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc agcagccgcg gtaatacggg ggggtgcaag 540
 cgtaaatcgg aattactggg cgtaaagcgc gcgtaggcgg ttaaacaagt cagatgtgaa 600
 agccccgggc tcaacctggg aactgcattt gaaactgttt agctagagtg tggtagagga 660
 gagtggaatt tcaggtgtag cggtgaaatg cgtagatata tgaaggaaca ccagtggcga 720
 aggcggctct ctggaccaac actgacgctg aggtgcgaaa gcgtgggtag caaacgggat 780
 tagatacccc ggtagtccac gccgtaaacg atgtcaacta actgttgggc gggtttccgc 840
 ttagtggtgc astaacgcaa taagttgacc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac 900
 tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgatgcaac 960
 gcgaagaacc ttacctacc ttgacataca gagaactttc tagagataga ttggtgcctt 1020
 cgggaactct gatacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt 1080
 taagtcccg aacgagcgn nycttatcct tagttgctac catttagttg ggcactctaa 1140
 ggagactgcc ggtgataaac cggaggaagg tggggacgac gtcaagtcac catggccctt 1200
 atgggtaggg ctacacacgt gctacaatgg ccggtacaga gggccgcaaa ctgcgagag 1260
 taagctaate ccttaaagcc ggtcctagtc cggattgcag tctgcaactc gactgcatga 1320
 agctggaate gctagtaate gcggatcaga atgccgcggt gaattcgttc ccgggccttg 1380
 tacacaccs ccgtcacacc atgggagtggt gttgcaaaag aagtgggtag gtaaaccttc 1440
 gggagggcgc tcaccacttt gtgattcatg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccct 1500
 aggggaacct ggggctggat cacctcctt 1539

<210> 4

<211> 1526

<212> DNA

<213> *Cycloclasticus pugetii*

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(1526)

<400> 4

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggcgcatgc taacacatgc aagtcgaacg 60
 gaaacgatgc tagcttgcta caggcgctga gtggcggacg ggtgagtaat gcataggaat 120
 ctacctaata gtgggggaca acctggtgaa aaccagctaa taccgcataa tccctacggg 180
 gcaaagcagg ggaccttcgg gccttgcgct aatagatgag cctatgtcgg attagctagt 240
 tggtagagta atggctcacc aaggcaacga tccgtagctg gtttgagagg atgatcagcc 300
 aactggggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattgcac 360
 aatggaggaa actctgatgc agcaatgccg cgtgtgtgaa gaaggcctta gggttgtaaa 420
 gcactttcag tagggaggaa aagttaagg ttaataacct taggccctga cgttacctac 480
 agaagaagca ccggctaact ccgtgccagc agccgcggtat atacggaggg tgcaagcggt 540
 aatcggaatt actgggcgta aaagcgcgcg taggcggtta aacaagtcag atgtgaaagc 600
 cccgggctca acttggaac tgcatttgaa actgtttagc tagagtgtgg tagaggagag 660
 tggaatttca ggtgtagcgg tgaaatgcgt agatatctga aggaacacca gtggcgaagg 720
 cggctctctg gaccaacact gacgtgagg tgcgaaagcg tgggtagcaa acgggattag 780
 ataccccggt agtccacgcc gtaaacgatg tcaactaact gttgggcggg tttccgctta 840
 gtggtgcant aacgcaataa gttgaccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca 900
 aatgaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg atgcaacgcg 960
 aagaacctta cctacccttg acatacagag aactttctag agatagattg gtgcttcggg 1020
 aactctgata cagggtctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag 1080
 tcccgtaacg agcgcaaccc ttatccttag ttgctacat ttagttgggc actctaagga 1140
 gactgccggt gataaaccgg aggaaggtgg ggacgacgtc aagtcacat ggcccttatg 1200
 ggtagggcta cacacgtgct acaatggccg gtacagaggg ccgcaaactc gcgagagtaa 1260
 gctaatecct taaagccggg cctagtccgg attgcagtct gcaactcgac tgcatgaagc 1320
 tggaatcgct agtaatcgcg gatcagaatg ccgcggtgaa ttcgttcccg ggccttgta 1380
 acaccgcccg tcacaccatg ggagtgggtt gcaaaagaag tgggtaggct aacttcggga 1440
 ggccgctcac cactttgtga ttcagtactg ggggtgaagtc gtaacaaggt agccctaggg 1500
 gaacctgggg ctggatcacc tcctta 1526

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

ggaaacccgc ccaacagt

18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 6

tgcaccacta agcggaaacc

20

<210> 7

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 7

ggaaacccgc ccaacagttg caccactaag cggaacc

38

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 8

agagtttgat cctggctcag

20

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 9

aaaggaggtg atccagcc

18

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号	FP00-004PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 7 1 1	国際出願日 (日.月.年) 2 4 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 5 . 0 8 . 9 9	
出願人 (氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

国際出願における発明の単一性の要件(PCT規則13.1)は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである(PCT規則13.2)。

そこで、本件国際出願の発明の単一性について検討する。

請求の範囲1-10の発明に共通する事項は「工程1)~4)を含む自然環境から特定機能

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/68, 1/04, C12N15/11 // (C12N15/11, C12R1:01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00-1/70, C12N15/11-15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, JICSTファイル (JOIS),
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	GEISELBRECHT, Allison D. et al., "Isolation of Marine Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading <i>Cycloclasticus</i> Strains from the Gulf of Mexico and Comparison of Their PAH Degradation Ability with That of Puget Sound <i>Cycloclasticus</i> Strains", Applied and Environmental Microbiology, December, 1998, Volume 64, Number 12, pages 4703-4710	11 1-10, 12-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 11. 00

国際調査報告の発送日

28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X A	✓ DYKSTERHOUSE, Sheryl E. et al., " <i>Cycloclasticus pugetii</i> gen. nov., sp. nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments", International Journal of Systematic Bacteriology, January, 1995, Volume 45, Number 1, pages 116-123	11 1-10, 12-23
X A	✓ GEISELBRECHT, Allison D. et al., "Enumeration and Phylogenetic Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Marine Bacteria from Puget Sound Sediments", Applied and Environmental Microbiology, September, 1996, Volume 62, Number 9, pages 3344-3349	11 1-10, 12-23
A	✓ JP, 10-155498, A (三井造船株式会社) 16.6月.1998 (16.06.98), (ファミリーなし)	1-10
A	✓ WALKER, John D., "Chemical Fate of Toxic Substances: Biodegradation of Petroleum", Marine Technology Society Journal, 1984, Volume 18, Number 3, pages 73-86	1-10
A	✓ HAINES, J. R., "Assessment of mixed culture for bioremediation product testing", In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4, 1997, pages 419-424	1-10
A	✓ JP, 9-98771, A (石川島播磨重工業株式会社) 15.4月.1997 (15.04.97), (ファミリーなし)	1-10
A	✓ HUU, Nguyen B. et al., "Marinobacter aquaeolei sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well", International Journal of Systematic Bacteriology, April, 1999, Volume 49, Part 2, pages 367-375	1-23

第Ⅱ欄の続き

微生物およびその遺伝子を検出および定量する方法」であるのに対し、請求の範囲11-23の発明に共通する事項は「*Cycloclasticus*属の石油分解細菌」であるから、請求の範囲1-10の発明と請求の範囲11-23の発明の間には、PCT規則13.2における「特別な技術的特徴」は存在しない。なお、請求の範囲5の発明は「石油を分解する微生物」に関連するものではあるが、「石油を分解する微生物」は本国際出願時に公知であったから、請求の範囲5の発明と請求の範囲11-23の発明の間にも、同「特別な技術的特徴」は存在しないといえる。

したがって、請求の範囲には、①請求の範囲1-10の発明、及び、②請求の範囲11-23の発明、の2発明が包含されている。